

# **Zweiphotonenuntersuchungen zur Rolle von Carotinoiden in der Regulation der Photosynthese**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Axel Wehling  
aus Braunschweig

|                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1. Referent:                        | Prof. Dr. P. J. Walla   |
| 2. Referent:                        | Prof. Dr. K.-H. Gericke |
| eingereicht am:                     | 26.07.2006              |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 12.10.2006              |

(2006)

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Hilbert, M., Wehling, A., Schlodder, E., Walla, P.J. Two-Photon-Sensitized Fluorescence and Excitation Spectra of Photosystem I of *Thermosynechococcus elongates*. J. Phys. Chem. B 108: 13022-13030 (2004).

Hilbert, M., Hippchen, H., Wehling, A. & Walla, P.J. Correlational Analysis of Proteins and Nonmetallic Nanoparticles in a Deep-Nulling Microscope. J. Phys. Chem. B 109: 18162-18170 (2005).

Wehling, A. & Walla, P.J. Time-Resolved Two-Photon Spectroscopy of Photosystem I Determines Hidden Carotenoid Dark-State Dynamics. J. Phys. Chem. B 109: 24510-24516 (2005).

Wehling, A. & Walla, P.J. A Two-Photon Excitation Study on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. Accepted by Photosynthesis Research (2006).

### Tagungsbeiträge

Wehling, A., Hilbert, M., Schlodder, E. & Walla, P. J.: Latest results from Fs-timeresolved 2-Photon Spectroscopy of Photosystem 1. (Poster) 104. Bunsentagung, Frankfurt a.M. (2005).

Wehling, A., Hilbert, M. & Walla, P. J.: Two-Photon Spectroscopy allows a direct Determination of the Carotenoid S<sub>1</sub> Contribution to Non-Photochemical Quenching and Light-Harvesting. (Poster) Gordon Conference on Photosynthesis, Smithfield, RI, USA (2005).

Wehling, A., Bode, S. & Walla, P. J.: A Two Photon Excitation Study on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. (Poster) Gordon Conference on Photosynthesis, Smithfield, RI, USA (2006).





## Abkürzungsverzeichnis

|                     |  |
|---------------------|--|
| ADP                 | Adenosindiphosphat                             |
| ATP                 | Adenosintriphosphat                            |
| BBO                 | Beta-Barium-Borat                              |
| Car                 | Carotin  |
| Chl a               | Chlorophyll a                                  |
| Chl b               | Chlorophyll b                                  |
| DDM                 | n-Dodecylmaltosid                              |
| Fd                  | Ferredoxin                                     |
| ISC                 | Inter System Crossing                          |
| LBO                 | LiB <sub>3</sub> O <sub>5</sub>                |
| LHC II              | Light Harvesting Complex II                    |
| NADPH               | Nicotinsäureamid-Adenosin Dinucleotid-Phosphat |
| Nd:YVO <sub>4</sub> | Neodym: Yttrium Vanadat                        |
| NDM                 | Negative Dispersion Mirror                     |
| NPQ                 | Non-photochemical quenching                    |
| OPE                 | one photon excitation                          |
| OPA                 | Optical Parametric Amplifier                   |
| P680                | Reaktionszentrum im PSII                       |
| P700                | Reaktionszentrum im PSI                        |
| pC                  | Plastocyanin                                   |
| Q                   | Plastoquinon                                   |
| QH <sub>2</sub>     | Plastoquinol                                   |
| PSI                 | Photosystem I                                  |
| PSII                | Photosystem II                                 |
| RegA                | Regenerative Amplifier                         |
| SHG                 | second harmonic generation                     |
| Ti:S                | Titan-Saphir                                   |
| TPE                 | two photon excitation                          |
| VxDE                | Violaxanthin-De-Epoxidase                      |
| Vio                 | Violaxanthin                                   |
| Zea                 | Zeaxanthin                                     |



# Inhaltsverzeichnis

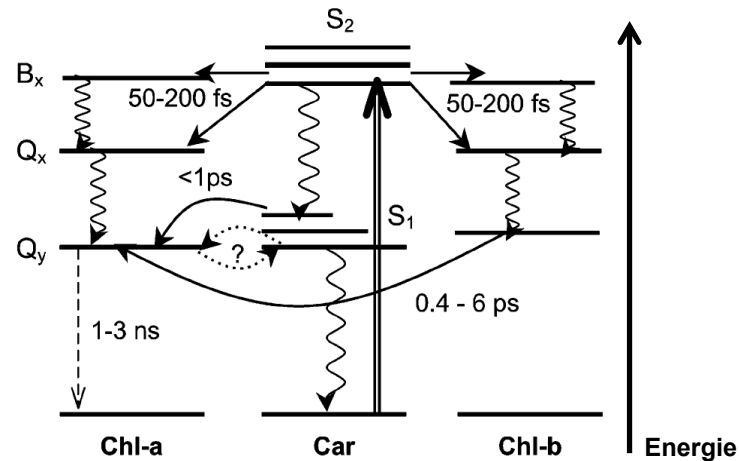
|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung und Ziele dieser Arbeit .....</b>                           | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Theoretischer Hintergrund .....</b>                                    | <b>3</b>  |
| 2.1      | Photosynthese .....   | 3         |
| 2.2      | Thylakoidmembranbestandteile der Lichtreaktionen.....                     | 4         |
| 2.3      | Dunkelreaktionen .....  | 8         |
| 2.4      | Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe .....                     | 9         |
| 2.4.1    | PS I .....  | 9         |
| 2.4.2    | PS II .....   | 13        |
| 2.4.3    | LHC II .....  | 16        |
| <b>3</b> | <b>Lichtsammelpigmente .....</b>  | <b>18</b> |
| 3.1      | Chlorophylle .....  | 18        |
| 3.2      | Carotinoide .....   | 21        |
| <b>4</b> | <b>Energie-Quenchingprozesse in Pflanzen .....</b>                        | <b>27</b> |
| <b>5</b> | <b>Energieübertragungsprozesse .....</b>                                  | <b>30</b> |
| <b>6</b> | <b>Experimenteller Aufbau .....</b>                                       | <b>34</b> |
| 6.1      | Das Lasersystem .....   | 34        |
| 6.1.1    | Vitesse Duo .....   | 35        |
| 6.1.2    | RegA 9000 .....   | 37        |
| 6.1.3    | Optical Parametric Amplifier (OPA) .....                                  | 39        |
| 6.2      | Pump-Probe-Aufbau .....   | 41        |
| 6.3      | Durchflussküvette .....   | 44        |
| 6.4      | Aufbau der Fluoreszenzmessungen .....                                     | 44        |
| 6.5      | Monochromator/Spektrograph und Detektoren .....                           | 46        |
| 6.6      | Digitale Datenaufnahme .....  | 46        |
| 6.7      | Pulscharakteristik .....  | 47        |
| <b>7</b> | <b>Zweiphotonen Pump-Probe Untersuchungen am PS I .....</b>               | <b>50</b> |
| 7.1      | Einführung .....  | 50        |
| 7.2      | Probenvorbereitung .....  | 51        |
| 7.3      | $\beta$ -Carotin-Dynamik nach Ein- und Zweiphotonenanregung im PS I ..... | 54        |
| 7.4      | Diskussion der Ergebnisse .....   | 60        |
| <b>8</b> | <b>Zweiphotonen-Fluoreszenzmessungen an lebenden Pflanzen .....</b>       | <b>66</b> |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 8.1       | Einführung .....   | 66         |
| 8.2       | Probenvorbereitung und experimentelle Durchführung ..... | 69         |
| 8.3       | Ergebnisse.....  | 71         |
| 8.4       | Diskussion der Ergebnisse .....                          | 77         |
| <b>9</b>  | <b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>                | <b>81</b>  |
| <b>10</b> | <b>Anhang.....</b>                                       | <b>84</b>  |
| <b>11</b> | <b>Literatur.....</b>                                    | <b>92</b>  |
| <b>12</b> | <b>Danksagung.....</b>                                   | <b>102</b> |

# 1 Einleitung und Ziele dieser Arbeit

Die Energie der Sonne spielt eine fundamentale Rolle für unseren Planeten. Die Nutzung und Umwandlung dieser Energie für biologische Zwecke fand wahrscheinlich erstmals vor 3,8 Milliarden Jahren in Form von anoxygener Photosynthese<sup>[1,2]</sup> und 300 Millionen Jahre später auch als oxygene Photosynthese statt<sup>[3]</sup>. Während der Evolution gelang es den Pflanzen, Algen und einigen Bakterien mit Hilfe der oxygenen Photosynthese die Sonneneinstrahlung auf sehr effiziente Weise für ihren Stoffwechsel zu nutzen und so den Grundstein für das heutige Leben auf diesem Planeten zu legen. Man muss sich dabei bewusst sein, dass die Entstehung aller fossilen Brennstoffe und aller tierischen und pflanzlichen Nahrung sowie des Luftsauerstoffs diesem einen Prinzip zugrunde liegen<sup>[4,5]</sup>. Das Verständnis der einzelnen partiellen Vorgänge der oxygenen Photosynthese ist deshalb für Wissenschaftler weltweit von Interesse.

Neben den Chlorophyllen spielen Carotinoide bei den Prozessen des Lichtsammelns und der Regulation der Photosynthese eine sehr wichtige Rolle. Diese Prozesse der Photosynthese, seien es Schutz- oder Lichtsammelprozesse von Carotinoiden und Chlorophyllen, laufen teilweise auf Zeitskalen im sub-Pikosekunden und Pikosekunden Bereich ab. Allerdings gab es bisher große Schwierigkeiten, die genaue Mechanismen dabei zu untersuchen, da der wichtige erste angeregte Zustand der Carotinoide aufgrund einfacher Auswahlregeln optisch verboten ist, und damit weder durch konventionelle Absorption- noch Fluoreszenzspektroskopie im intakten photosynthetischen Apparat untersucht werden konnte.<sup>[6]</sup> Durch die Umkehr der Auswahlregeln ist es mit dem Vorgang der Zweiphotonenanregung allerdings möglich, genau diesen Zustand der Carotinoide selektiv zu bevölkern, um so die photosynthetisch-relevanten Energietransferprozesse zu untersuchen<sup>[7,13]</sup>. Für den Prozess des Lichtsammelns sind verschiedene Pigment-Protein-Komplexe verantwortlich. Abbildung 1-1 zeigt ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm mit einigen der möglichen Energietransferwegen zwischen den vorhandenen Pigmenten in einem dieser Pigment-Protein-Komplexe, dem Lichtsammelkomplex II. Hier ist speziell nur die Anregung in den  $S_2$ -Zustand der Carotinoide berücksichtigt.



**Abbildung 1-1: Jablonski-Diagramm mit Energietransferwegen und Zeiten im Lichtsammelkomplex II nach Anregung des Carotin S<sub>2</sub>-Zustandes<sup>[14]</sup>.**

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und die Inbetriebnahme eines Femtosekunden-Laseraufbaus, mit dessen Hilfe man in der Lage ist, durch Zweiphotonenanregung „dunkler“ Carotin S<sub>1</sub>-Zustände Einblicke in die Dynamik und Populationen dieser Zustände zu bekommen. Die Umsetzung dieser Aufgabe erfolgte auf der einen Seite durch Aufdeckung der Carotin-Energietransferpfade im Photosystem I mittels Pump-Probe Experimenten und auf der anderen Seite durch Untersuchung des Prozesses des nichtphotochemischen Quenchings mittels zweiphotonen Fluoreszenzmessungen.

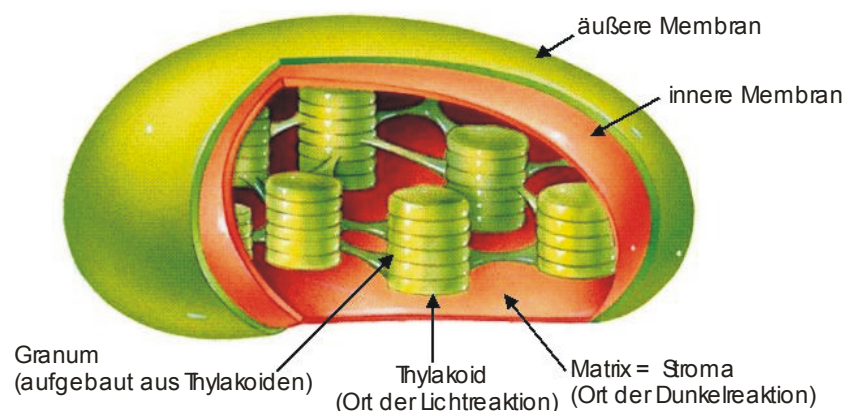
Der Prozess des nichtphotochemischen Quenchings (NPQ) ist für natürliche und gentechnisch modifizierte Pflanzen überlebenswichtig, da er überschüssige Energie, welche bei hohen Lichtintensitäten auftritt als Wärme abführt. Es wird vermutet, dass dabei Carotinoide eine entscheidende Rolle spielen, was aber bisher aufgrund des optisch verbotenen Charakters des ersten angeregten Zustandes noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Photosynthese<sup>[4,15]</sup>

Die oxygene Photosynthese ist mit Abstand der effektivste Prozess zur Umsetzung und Speicherung der Sonnenenergie. Durch sie ist es Cyanophyta (Cyanobakterien bzw. Blaualgen), phototrophen Bakterien, Algen und höheren Pflanzen möglich, das Sonnenlicht zur Synthese energiereicher, organischer Kohlenstoffverbindungen zu nutzen. Die so erzeugte Biomasse bildet die Basis aller Nahrungsketten auf der Erde. Die Bedeutung der Photosynthese steht aber auch bezogen auf die globalen Klimaveränderungen zunehmend im Blickpunkt: Photosynthetische Organismen beeinflussen durch die Produktion von molekularem Sauerstoff und insbesondere durch die Bindung des Treibhausgases Kohlendioxid (ca.  $10^{10}$  t pro Jahr) die Chemie der Atmosphäre.

In höheren Pflanzen findet die Photosynthese in den Chloroplasten (Abbildung 2-1) statt. Ihr Aufbau wird von drei Membranhüllen bestimmt: Der äußeren, der inneren und der Thylakoidmembran. Doch nur die äußere dieser drei Membranen ist weitestgehend durchlässig für die meisten Moleküle und Ionen.



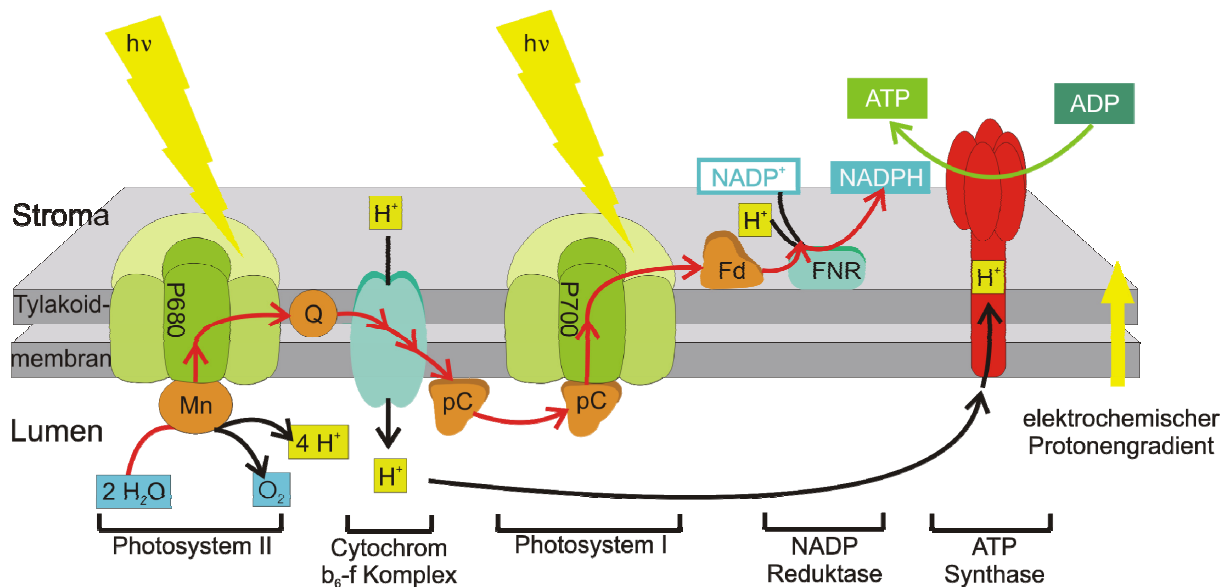
**Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Chloroplasten<sup>[4]</sup>**

Die Thylakoidmembranen beherbergen die für die Photosynthese wichtigen Proteine und bilden innerhalb der Chloroplasten dicht gepackte Stapel, so genannte Grana. Sie sind räumlich durch das Stroma voneinander getrennt.

Die Photosynthese lässt sich allgemein in zwei wichtige Abschnitte aufteilen: die Licht- und die Dunkelreaktionen. Die Lichtreaktionen umfassen die Absorption des Lichtes mit Hilfe der in den Lichtsammelkomplexen enthaltenen Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide) und die Weiterleitung der aufgenommenen Energie an das jeweilige Reaktionszentrum, sowie eine Reihe von hintereinander geschalteten Energie- und Elektronentransferprozessen. Die Dunkelreaktionen beinhalten all jene Prozesse, die zur Bindung von  $\text{CO}_2$  und der daraus resultierenden Synthese von speicherfähigen Zuckerendprodukten verantwortlich sind.

## 2.2 Thylakoidmembranbestandteile der Lichtreaktionen

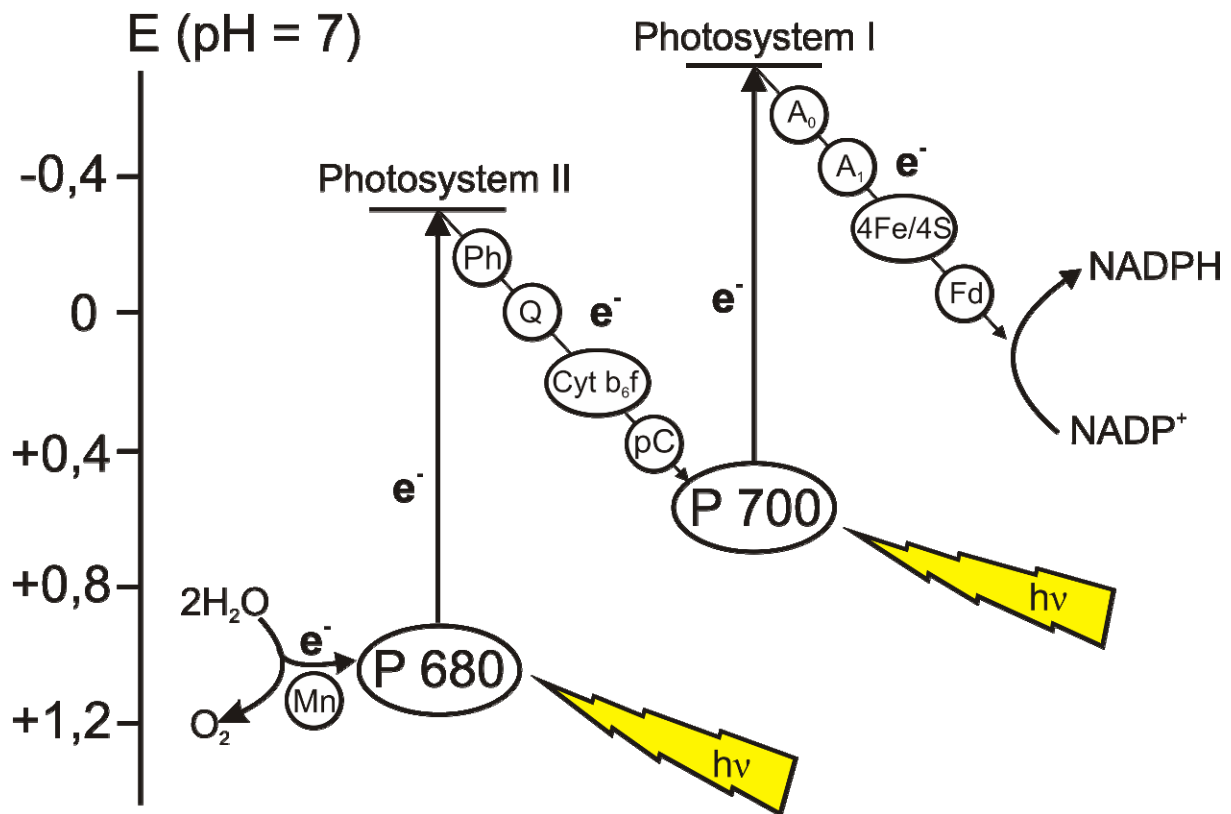
An der Lichtreaktion beteiligen sich vier Proteinkomplexe, die in die Thylakoidmembran eingebettet sind.



**Abbildung 2-2: Querschnitt durch die Thylakoidmembran; die für die Lichtreaktion benötigten Enzyme sind dargestellt:** Nach Absorption von zwei Photonen wird im Photosystem II (PS II) durch transmembranen Elektronentransfer freies Plastochinon ( $\text{Q}_\text{B}$ ) zum Hydrochinon reduziert. Dieses verlässt das Protein und wird durch den Cytochrom  $\text{b}_6\text{f}$ -Komplex (Cyt  $\text{b}_6\text{f}$ ) reoxidiert. Das  $\text{P680}^+$ -Kation oxidiert die Wasseroxidase (OEC, oxygen evolving complex), an welcher Wasser zu Sauerstoff und Protonen oxidiert wird. Die bei der Reoxidation des  $\text{Q}_\text{B}$  freiwerdenden Protonen werden ins Lumen (das Innere, der durch die Thylakoidmembranen abgetrennte Bereiche) abgegeben, die Elektronen auf Plastocyanin ( $\text{pC}$ ) übertragen. Das  $\text{pC}$  wird zur Rereduktion des nach Lichtanregung oxidierten  $\text{P700}^+$  im Photosystem I (PS I) genutzt. Im PS I wird nach transmembranem Elektronentransfer das Elektron auf Ferredoxin ( $\text{Fd}$ ) übertragen, welches  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  reduziert (katalysiert durch Ferredoxinreduktase, FNR). Der zwischen Lumen und Stroma aufgebaute Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP genutzt. Rote Pfeile stellen den Elektronentransport dar, schwarze Pfeile den Protonentransport<sup>[16]</sup>.



Das Redoxpotential der einzelnen Pigmentkomplexe und der an die Systeme koppelnden Komponenten in Verbindung mit dem Energie- bzw. Elektronenfluss in der Thylakoidmembran kann in einem so genannten Z-Schema dargestellt werden.

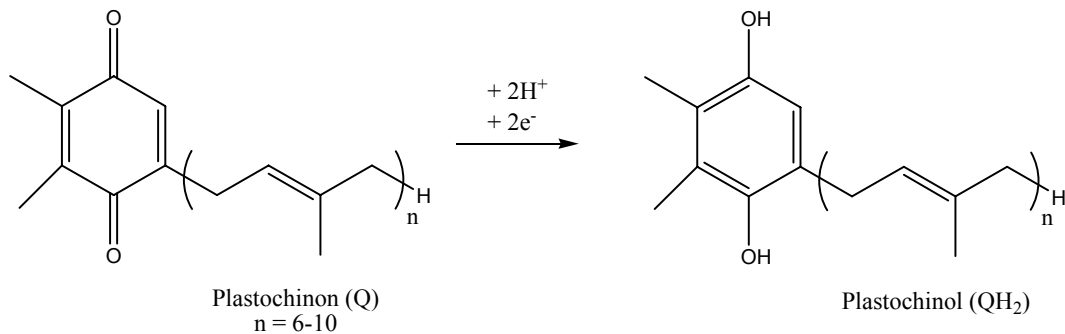


**Abbildung 2-3: Elektronenfluss in der Thylakoidmembran in Abhängigkeit des Redoxpotentials der einzelnen Bestandteile (Ph = Pheophytin, Q = Plastochinon, Cyt  $b_6f$  = Cytochrom-Komplex, pC = Plastocyanin,  $A_0$  = Chlorophyll-Akzeptor,  $A_1$  = Chinon-Akzeptor, Fd = Ferredoxin) (frei nach D.-P. Häder<sup>[17]</sup>).**

- Photosystem II (PS II)

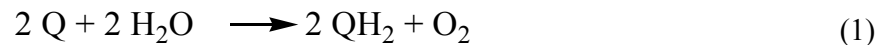
Die Lichtabsorption im Photosystem II bewirkt zwei Vorgänge: zum einen die Oxidation von Wasser und zum anderen die Reduktion von Plastochinon (Q). Das absorbierte Licht wird auf das so genannte Special Pair übertragen, das aus zwei dicht zusammen liegenden Chlorophyllen (P680) besteht. Nach der Anregung überträgt P680 schnell ein Elektron ( $\tau_{Ox} = 3$  ps) auf benachbartes Pheophytin (Ph a) (ein Chlorophyll, bei dem  $Mg^{2+}$  gegen zwei Protonen getauscht ist). Diese relativ hohe Geschwindigkeit verhindert die Relaxation in den Grundzustand durch Abgabe von Wärme. Eine weitere Hemmung der Rückreaktion wird durch die Vergrößerung des Abstandes zum Reaktionszentrum durch Weiterleiten des

Elektrons in den Chinonpool ( $Q_A$  für gebundenes und  $Q_B$  für freies Plastochinon) erreicht ( $\tau_{\text{Weiterleitung}} = 200 \text{ ps}$ ). Dort erfolgt nach Ankunft eines weiteren Elektrons und der Aufnahme von zwei Protonen die Reaktion zu einem Plastochinol-Molekül ( $QH_2$ ).



**Abbildung 2-4: Reduktion des Chinons zu dem entsprechenden Chinol**

Mit Hilfe des angrenzenden Mangancusters wird das sehr starke Oxidationsmittel  $P680^+$  ( $E^\circ = +1,229 \text{ V}$  bei pH 7) wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt. Der Cluster ist aufgrund seiner vielfältigen Oxidationsstufen und seiner Proteinumgebung in der Lage, das Sauerstoffatom des Wassers ( $E^\circ = +0,82 \text{ V}$  bei pH 7) stufenweise zu molekularem  $O_2$  zu oxidieren. Zusammengefasst ergibt sich folgende lichtinduzierte Reaktion:



Parallel hierzu besteht die zweite wichtige Aufgabe des Photosystems II in der Erzeugung eines Protonengradienten zwischen dem Stroma und dem Thylakoidlumen. Dieses führt durch die bei der Oxidation des Wassers freiwerdenden Protonen zu einer Herabsetzung des pH-Wertes innerhalb der Thylakoidmembranen (Lumen) und durch den Verbrauch von  $H^+$ -Ionen bei der Chinonreduktion zu einer Erhöhung des pH-Wertes außerhalb der Membranen.

- Cytochrom  $-b_6f$ -Komplex

Die Vorgänge im Cytochrom- $b_6f$ -Komplex zählen zu den Lichtreaktionen, weil sie die energetische Kopplung der beiden Photosysteme bewirken. Die genaue Aufgabe dieses Bereiches der Thylakoidmembran besteht darin, die beiden Elektronen, die bei der Oxidation des Plastochinols entstehen, einzeln weiterzugeben. Hierzu werden die Elektronen einzeln auf ein Kupferprotein, das Plastocyanin (pC) übertragen und reduzieren hier das  $Cu^{2+}$ -Kation zum

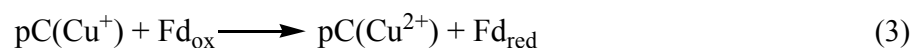
Cu<sup>+</sup>-Reaktionszentrum. Das zweimalige Durchlaufen dieses Prozesses beschreibt folgende Gleichung:



Die Reaktionsgleichung macht die Protonenverschiebungen deutlich, die den Protonengradienten zwischen Stroma und Thylakoidlumen weiter verstärken.

- Photosystem I (PS I)

Im Photosystem I laufen grundsätzlich ähnliche Vorgänge wie im Photosystem II ab. Die über mehrere Lichtsammelpigmente zum Special Pair (P700) geleitete Lichtenergie verursacht ebenfalls eine Ladungstrennung. Das angeregte Chlorophyll-Molekül gibt ein Elektron an ein Chinon ab und von dort wird es über mehrere Eisen-Schwefel-Cluster des Riesketyps (4Fe4S) zum Ferredoxin (Fd) geleitet. Die Wiederherstellung des Ausgangszustandes des entstandenen P700<sup>+</sup>-Zentrums erfolgt durch das im Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplex gebildete Plastocyanin (pC).

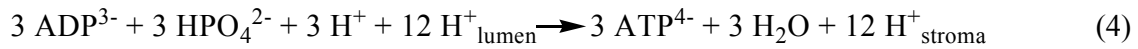


Die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) katalysiert die Bildung von Nicotinsäureamid-Adenosin Dinucleotid-Phosphat (NADPH) aus dem oxidierten Ferredoxin und NADP<sup>+</sup>. Sollte jedoch NADP<sup>+</sup> nicht in ausreichender Menge vorhanden sein, so kann das Ferredoxin die Aufgabe des Plastochinols im Cytochrom-b<sub>6</sub>f-Komplex übernehmen und zur Erhöhung des Protonengradienten zwischen Stroma und Thylakoidlumen beitragen.

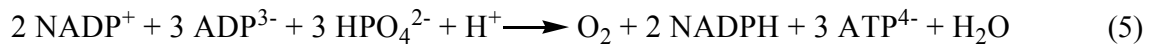
- ATP-Synthase

Die Knüpfung einer Anhydridbindung zwischen Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat erzeugt Adenosintriphosphat (ATP), den universellen Energiespeicher (Standard-Gibbs-Energie  $\Delta G^\circ = -30 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) der Zellen. Bei der ATP-Synthese wird der aufgebaute Protonengradient zur Katalyse der Phosphorylierung von ADP verwendet. Dabei reicht die

Triebkraft von vier Photonen zur Bildung eines ATP-Moleküls gemäß folgender Gleichung aus:



Zusammenfassend ergibt sich also bei der Absorption von vier Photonen in den beiden Photosystemen folgende Gesamtgleichung:



## 2.3 Dunkelreaktionen

Die Dunkelreaktion der Photosynthese wird hier nur kurz skizziert, um das Gesamtverständnis des Prozesses zu gewährleisten. Sie bezeichnet die Reaktionen der Photosynthese, die ohne direkte Beteiligung von Photonen ablaufen und im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind. Die durch die Lichtreaktionen erzeugten Speicherstoffe NADPH und ATP werden dazu verwendet, aus der Luft absorbiertes  $\text{CO}_2$  im so genannten Calvin-Zyklus zu Kohlenhydraten zu reduzieren.

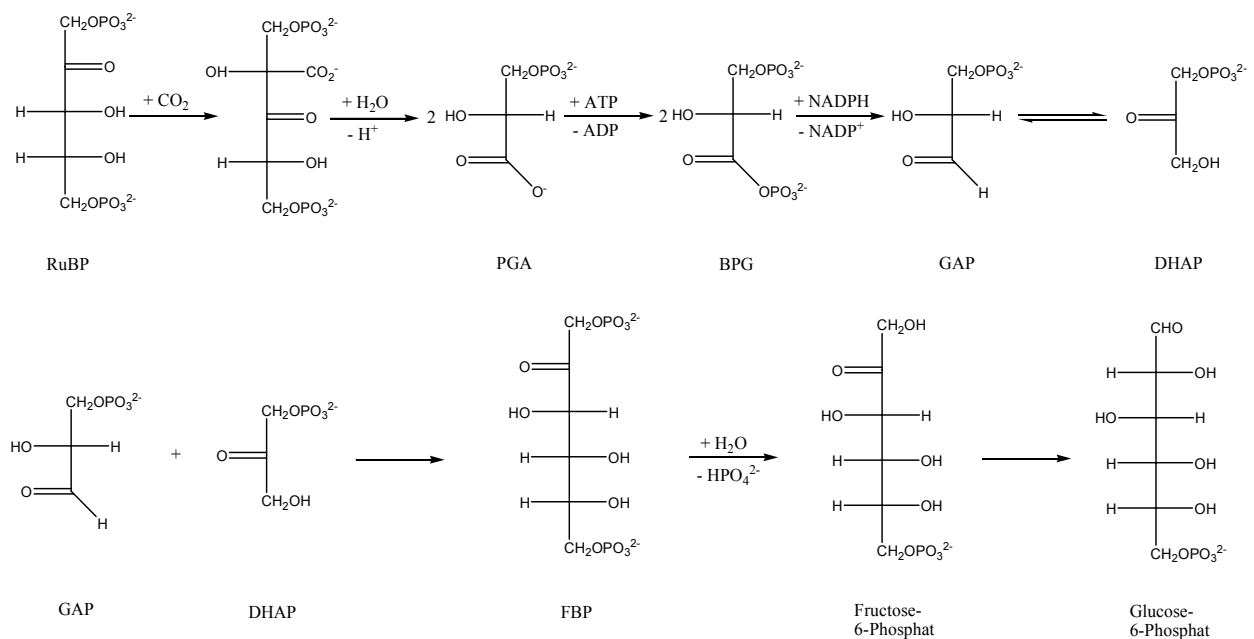


Abbildung 2-5: Kohlenhydratsynthese der Dunkelreaktion

Dieses verläuft schematisch in drei Schritten:

- Die eigentliche Fixierung des Kohlenstoffs, chemisch gesehen eine Carboxylierung,
- eine Reduktionsphase, die nach jeweils drei Zyklen einen C3-Körper liefert,
- eine Regenerationsphase, die der Regenerierung des Kohlenstoffakzeptors dient, einem C5-Körper.

Im Einzelnen betrachtet, erfolgt die Fixierung des  $\text{CO}_2$  an im Stroma gelöstem Ribulose-1,5-biphosphat (RuBP). Katalysator dieser Reaktion ist Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase (Rubisco). Dabei entsteht ein instabiler C6-Körper, der schnell zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (PGA) hydrolysiert. Es wird nach Phosphorylierung der Carboxylatgruppe mit ATP durch NADPH zum entsprechenden Aldehyd, Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), reduziert. Dieses Molekül steht in einer Keto-Enol-Tautomerie im Gleichgewicht mit Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und reagiert in einer Aldolreaktion mit seinem Konstitutionsisomer zu einer Hexose, dem Fructose-1,6-biphosphat (FBP). Nach Abspaltung der Phosphatgruppe in 1-Position, steht der Zucker sowohl als Fructose-6-phosphat als auch durch Isomerisierung entstandenes Glucose-6-phosphat als Baustein zum Aufbau von Saccharose und Stärke zur Verfügung. Um den Kreislauf zu schließen, wird der C5-Baustein RuBP mit Hilfe von ATP wieder zurückgebildet.

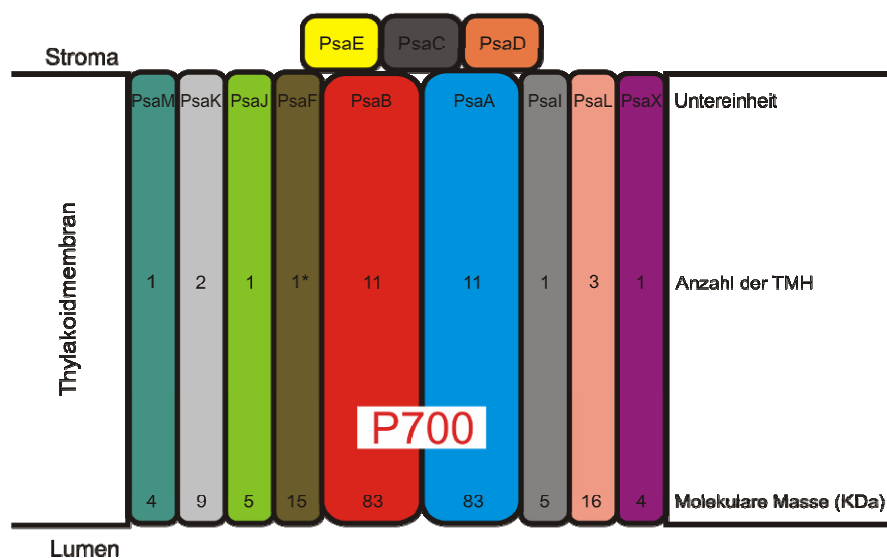
## 2.4 Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe

In dieser Arbeit wurde die Interaktion speziell bei der Energieübertragung zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen untersucht, weshalb auf eine ausführliche Beschreibung der Proteinkomplexe verzichtet wird, während besonders die für diese Arbeit wichtigen Pigmente im räumlichen Kontext dargestellt werden.

### 2.4.1 PS I

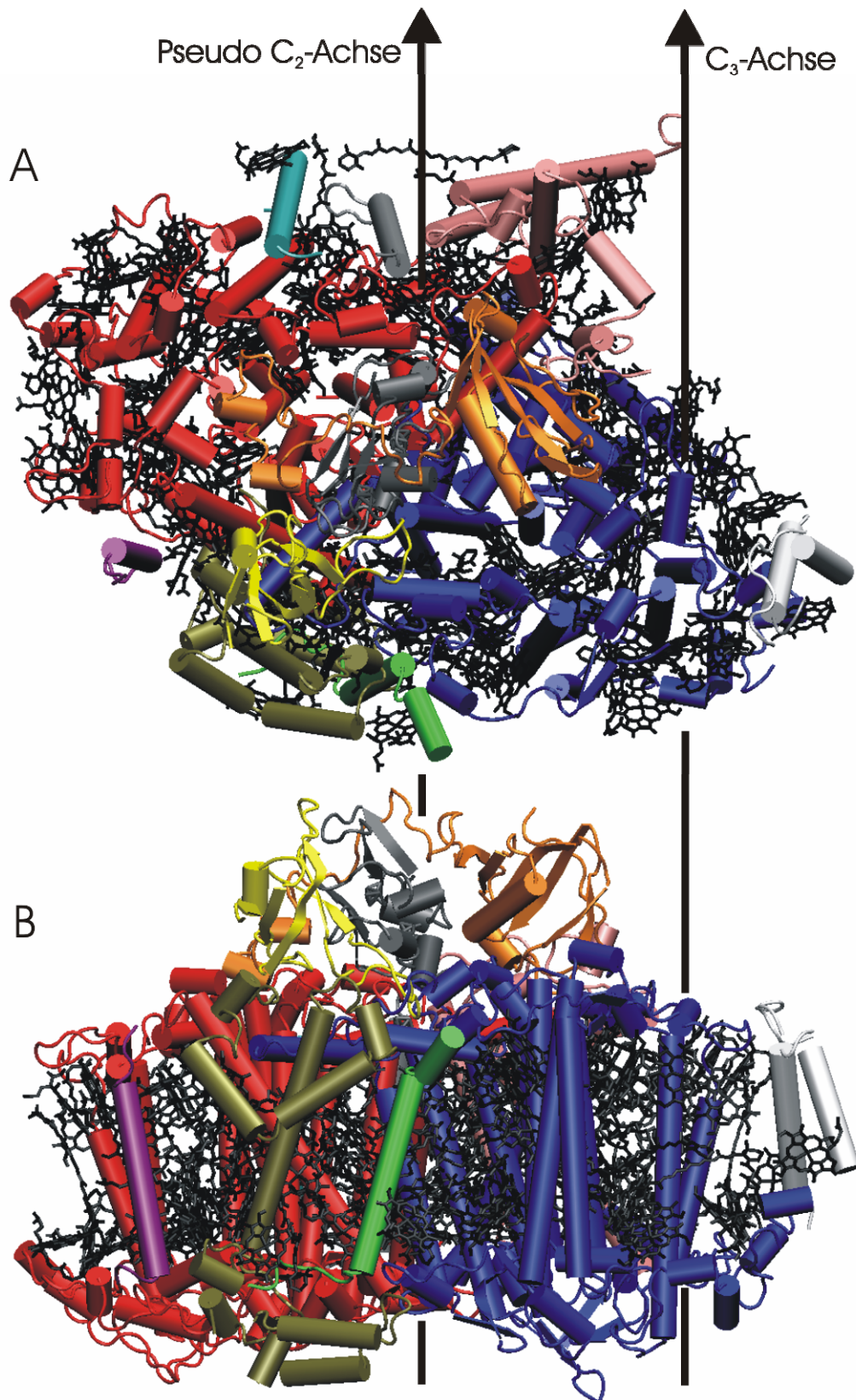
Der PS I-Komplex aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* ist in einer sehr viel genaueren Auflösung bekannt als sein pflanzliches Gegenstück<sup>[18]</sup>. Die Unterschiede bezüglich Struktur und Funktionalität zwischen dem pflanzlichem und dem cyanobakteriellem PS I bestehen hauptsächlich in der Komposition der Untereinheiten und der Verknüpfung mit den peripheren Lichtsammelantennen<sup>[19]</sup>. Die Protein-Komplexe sind

thermisch stabil und dadurch für Untersuchungen bei Raumtemperatur geeignet. Die trimere, scheibenförmige Kristallstruktur besteht aus drei identischen Monomeren und wurde im Jahr 2001 mit einer Auflösung von 2,5 Å von Jordan et al. veröffentlicht<sup>[20]</sup>. Die Abmessungen des Trimers sind 210 Å als Durchmesser und maximal 90 Å in der Höhe. Die zentralen Einheiten des Monomers sind die großen Untereinheiten PsaA und PsaB, die den primären Donor (P700) umschließen und eine pseudo-C<sub>2</sub>-Achse bilden. Darüber hinaus besteht das Monomer aus sieben Untereinheiten mit transmembranalen  $\alpha$ -Helices, drei stromalen Untereinheiten, welche für die Bindung an das Ferredoxin (PsaE, PsaC und PsaD) verantwortlich sind und 127 Kofaktoren. Abbildung 2-6 verdeutlicht die Nomenklatur der Untereinheiten mit Blick durch die Thylakoidmembran. Die Namen der Untereinheiten sind den jeweiligen Farben sowie der Anzahl der transmembranen  $\alpha$ -Helices zugeordnet und basieren auf den Genen PsaA bis PsaX.



**Abbildung 2-6: Schematische Anordnung der Protein-Untereinheiten im monomeren Photosystem I. Angegeben sind Informationen über das Molekulargewicht in KDa, sowie die Anzahl der transmembranen  $\alpha$ -Helices (TMH) der jeweiligen Untereinheit<sup>[19]</sup>.**

Die Abbildungen 2-7 und 2-8 auf den folgenden Seiten zeigen die Kristallstrukturen des PS I jeweils mit Blick auf die stromale Seite und als Querschnitt durch die Thylakoidmembran. Die Auflösung der Struktur reichte aus, die 127 Kofaktoren des Komplexes im Hinblick auf Struktur und Konformation eindeutig zuzuordnen. Die für diese Arbeit relevanten Kofaktoren gliedern sich in 22 Carotinoide ( $\beta$ -Carotin) und 96 Chlorophylle (Chl a). Außerdem wurden zwei Phyllochinone, drei Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Zentren und vier Lipide räumlich zugeordnet.



**Abbildung 2-7:** A) Monomereinheit des PS I mit Blick von der stromalen Seite. Die gesamten Kofaktoren sind schwarz dargestellt. Die Farben der Proteine entsprechen denen aus Abbildung 2-6; B) Seitenansicht derselben Einheit, dargestellt sind außerdem die beiden Drehachsen des Komplexes (dargestellt mit VMD<sup>®</sup>, PDB-Code: 1JB0).



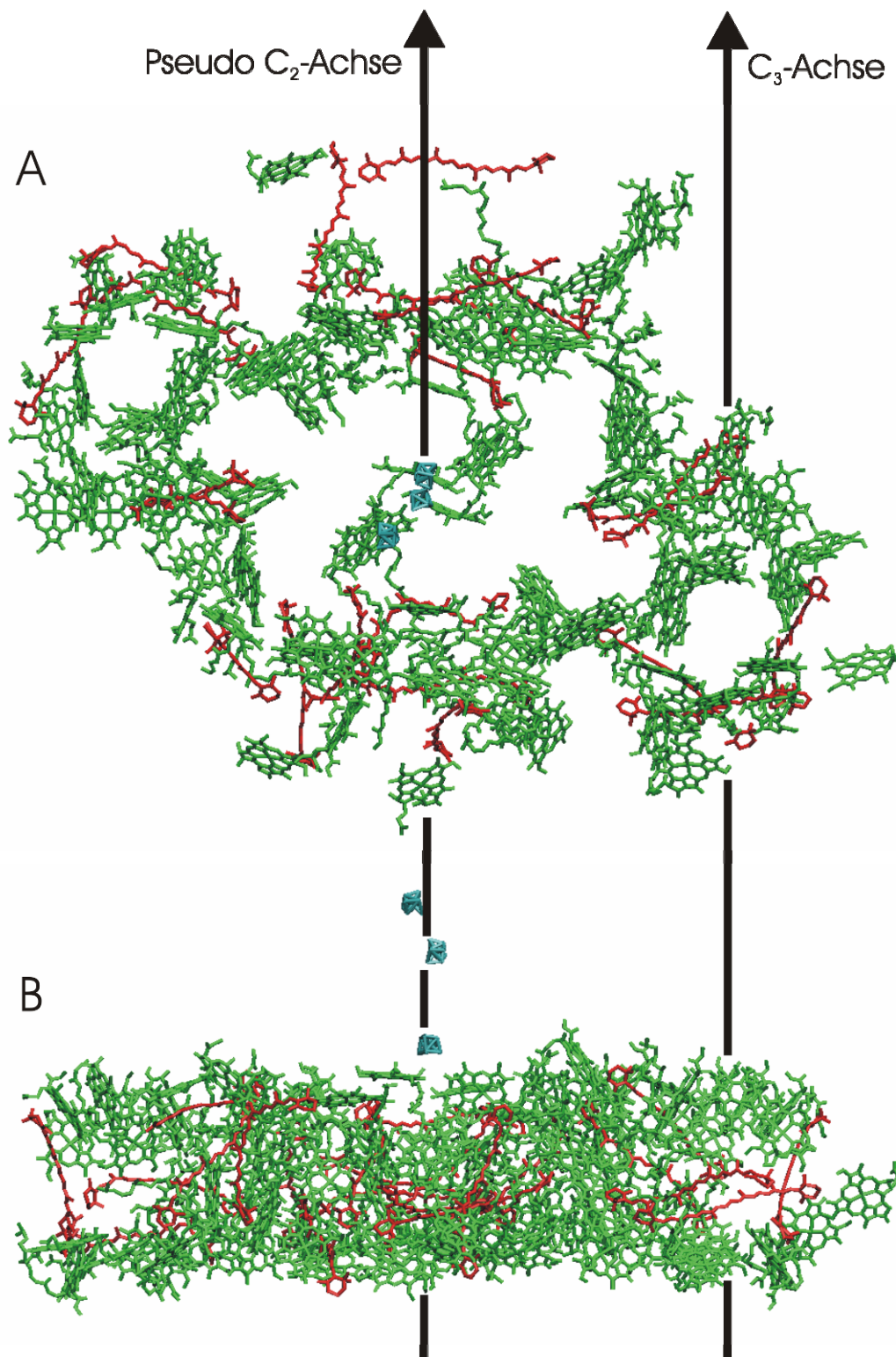


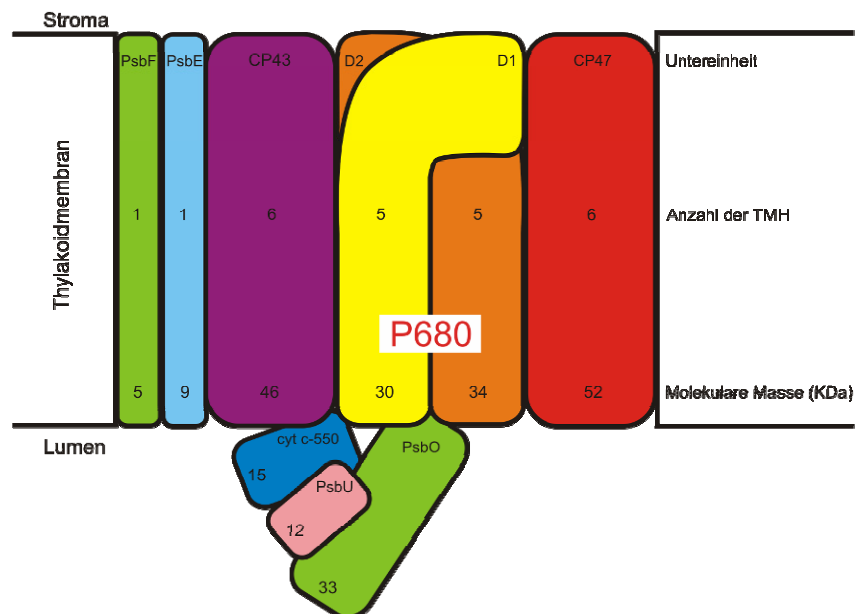
Abbildung 2-8: A) Darstellung der Kofaktoren des monomeren PS I Chlorophyll a (grün) und  $\beta$ -Carotin (rot) sowie der drei Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster (türkis) zur Orientierung von der stromalen Seite; B) Ansicht als Querschnitt durch die Thylakoidmembran. Die Drehachsen sind ebenfalls eingezeichnet (dargestellt mit VMD<sup>®</sup>, PDB-Code: 1JB0).



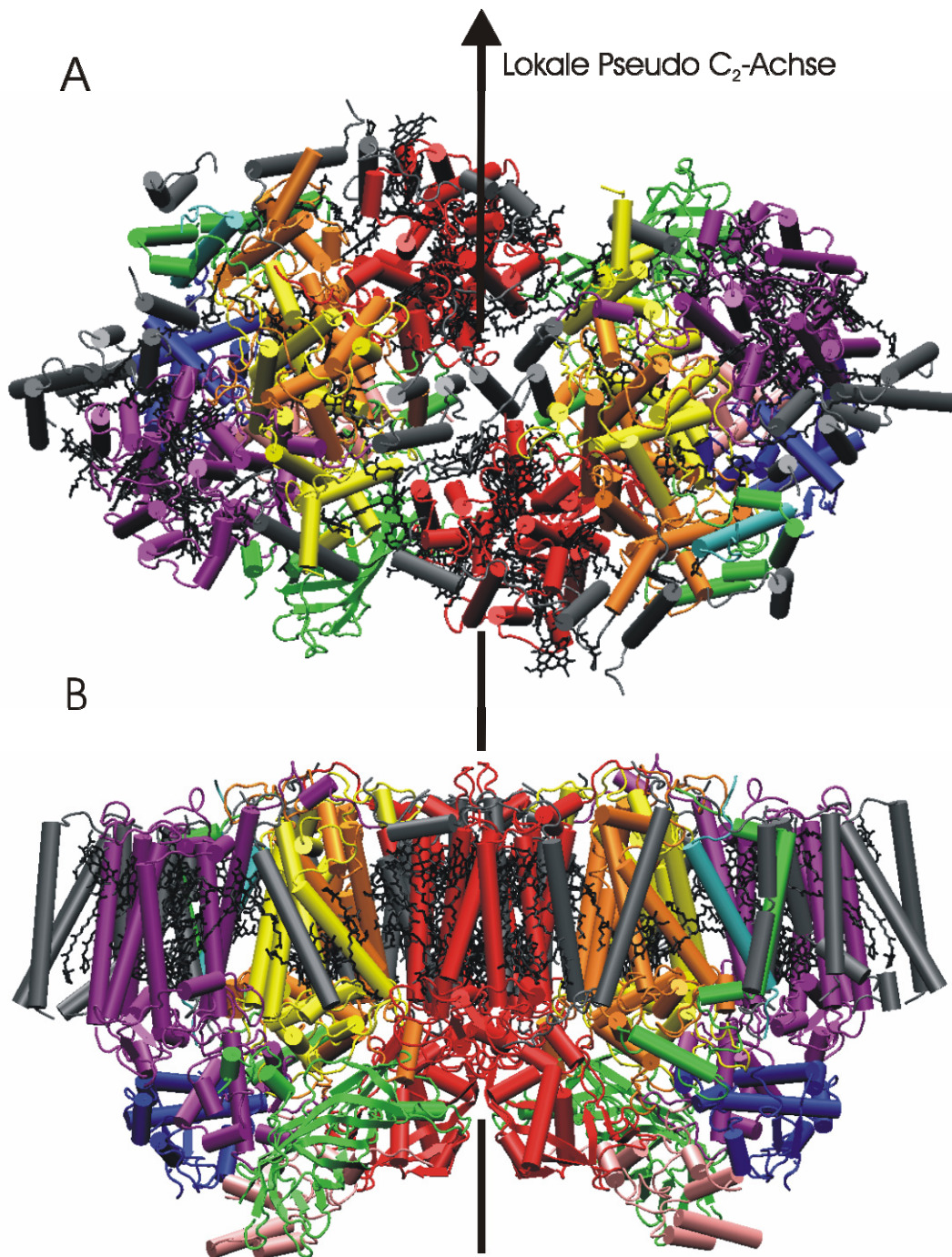
Von den 22 Carotinoiden ( $20 \pm 4$  aus spektroskopischen Daten) liegen 16 in kompletter trans-Konformation vor, fünf von ihnen besitzen eine oder zwei cis-Doppelbindungen und ein Molekül ist unvollständig<sup>[20]</sup>. Die Carotinoide sind tief in die Thylakoidmembran eingebettet und nur an wenigen Stellen nahe der Oberfläche zu Stroma oder Lumen. Aus den kristallografisch gewonnenen Abständen der Chlorophylle berechneten Byrdin et al. unter Annahme eines Förstermechanismus die Geschwindigkeitskonstanten des Energietransfers<sup>[21]</sup>. Fleming et al. konnten aus den berechneten Energien der Chlorophylle das Absorptionsspektrum rekonstruieren<sup>[22]</sup>.

### 2.4.2 PS II

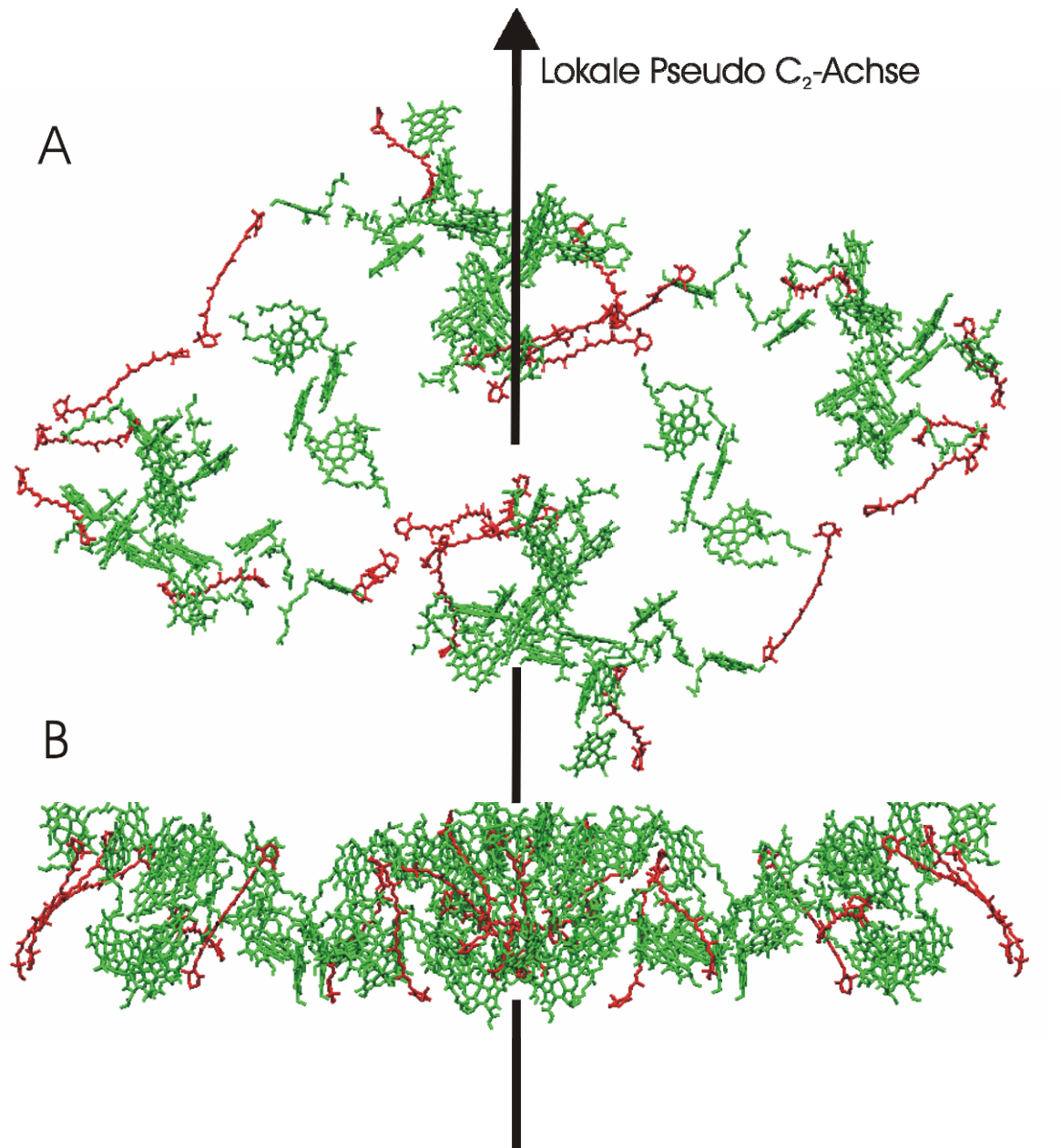
Die Struktur des cyanobakteriellen Photosystems II aus *Thermosynechococcus elongatus* wurde aufgrund von Kristallisationsproblemen erst später und in schlechterer Auflösung aufgeklärt als die des PS I. Sie wurde erstmals mit einer 3,8 Å Auflösung von Zuoni et al. im Jahr 2001 veröffentlicht<sup>[23]</sup>. Loll et al. konnten die Auflösung im Jahr 2005 auf 3,2 Å verbessern und die Kofaktoren mit einer Auflösung von 3,0 Å darstellen<sup>[24]</sup>. Die nachfolgende Abbildung 2-9 zeigt die schematische Anordnung der größten Proteinuntereinheiten des monomeren Komplexes.



**Abbildung 2-9: Schematischer Aufbau der Protein-Untereinheiten im monomeren Photosystem II. Zur Übersichtlichkeit wurden kleinere Untereinheiten weggelassen. Weiterhin sind Informationen über das Molekulargewicht in KDa, sowie die Anzahl der transmembranen  $\alpha$ -Helices (TMH) der jeweiligen Untereinheit angegeben (frei nach B. Loll<sup>[25]</sup>).**



**Abbildung 2-10:** A) Homodimer des PS II mit Blick von der stromalen Seite. Die gesamten Kofaktoren sind schwarz dargestellt. Die Farben entsprechen denen aus Abbildung 2-9; B) Seitenansicht derselben Einheit, dargestellt ist außerdem die Drehachse des Komplexes (dargestellt mit VMD<sup>®</sup>, PDB-Code: 1W5C).



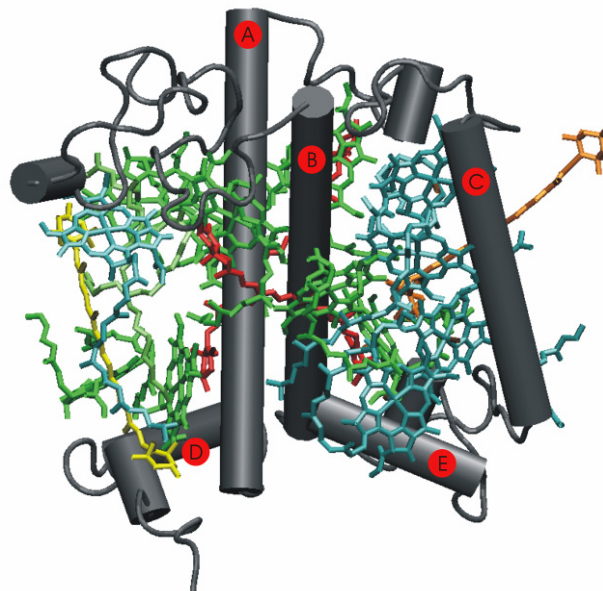
**Abbildung 2-11: A) Darstellung der Kofaktoren Chlorophyll a (grün) und β-Carotin (rot) des Homodimers PS II von der stromalen Seite; B) als Querschnitt durch die Thylakoidmembran inklusive Drehachse (dargestellt mit VMD®, PDB-Code: 1W5C).**

Die monomere Struktur enthält mindestens 17 Protein-Untereinheiten, davon sind 14 membranständig und drei liegen auf der lumenalen Seite. Das kristallisierte, cyanobakterielle PS II liegt hierbei immer als Homodimer vor, nur in höheren Pflanzen wurden auch Monomere beobachtet<sup>[26-29]</sup>. Das Reaktionszentrum mit dem primären Donor (P680) wird durch die beiden Untereinheiten D1 (PsbA) und D2 (PsbD) gebildet. Ihre veraltete Nomenklatur resultiert aus dem diffusen Laufverhalten bei der Gelelektrophorese. Die

Untereinheiten PsbE und PsbF bilden zusammen das Cytochrom-b-559. Nicht zugeordnete Untereinheiten wurden in den Kristallstrukturen grau dargestellt. Der monomere Komplex enthält 77 Kofaktoren, von denen 35 Chlorophyll a und elf  $\beta$ -Carotin Moleküle darstellen. Die Carotine befinden sich in kompletter trans-Konformation. Zwei von ihnen sind an die D1/D2-Untereinheiten gebunden, drei an die CP43- und fünf an die CP47-Untereinheit. Carotin Nummer elf befindet sich zwischen hier nicht zugeordneten Untereinheiten in Nachbarschaft zur Cytochrom-b-559 Gruppe<sup>[24]</sup>.

### 2.4.3 LHC II

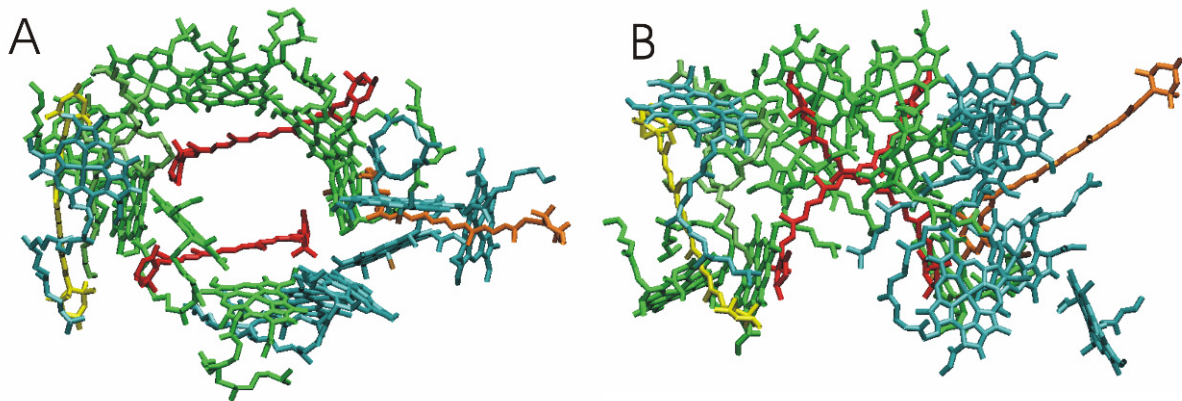
Der Lichtsammelkomplex II (LHC II = light harvesting complex II) ist der wichtigste Lichtsammelkomplex in grünen Pflanzen und umgibt die beiden Reaktionszentren PS II und PS I. Die von Liu et al. im Jahr 2004 veröffentlichte Struktur aus Spinat<sup>[30]</sup> besitzt eine Auflösung von 2,75 Å, wodurch eine genaue Zuordnung der einzelnen Bestandteile möglich wurde. Eine monomere Einheit des sonst als Trimer vorliegenden Komplexes besteht aus drei transmembranen  $\alpha$ -Helices (A, B und C) und zwei weiteren  $\alpha$ -Helices D und E, dargestellt in Abbildung 2-12.



**Abbildung 2-12: Monomereinheit des Lichtsammelkomplexes II (LHC II) in der Seitenansicht. Proteine sind grau, Chlorophyll a grün, Chlorophyll b türkis, Lutein rot, Neoxanthin orange und Violaxanthin gelb markiert (dargestellt mit VMD<sup>®</sup>, PDB-Code: 1RWT).**



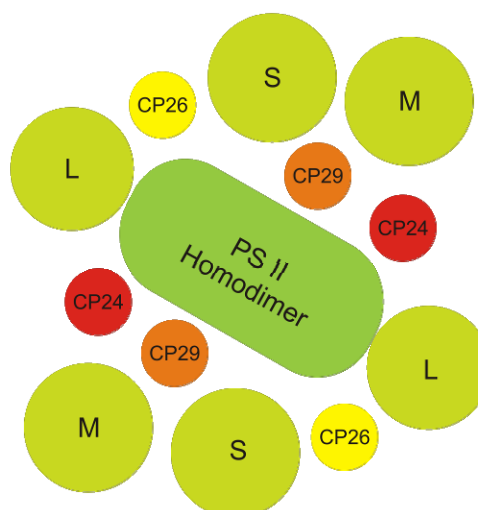
Das Monomer besteht aus 18 Pigmenten: 14 Chlorophylle (acht Chl a, sechs Chl b) und vier Carotinoide (zwei Lutein, ein Neoxanthin und ein Violaxanthin). Abbildung 2-13 verdeutlicht die räumliche Struktur der Pigmente in Auf- und Seitenansicht.



**Abbildung 2-13: Anordnung der Pigmente im monomeren Lichtsammelkomplex II a) in der Aufsicht, b) in der Seitenansicht (Chl a grün, Chl b türkis, Lutein rot, Neoxanthin orange, Violaxanthin gelb) (dargestellt mit VMD<sup>®</sup>, PDB-Code: 1RWT).**

Die Violaxanthinposition am Rand des Komplexes ist von den Xanthophyll-Zyklus-Carotinoiden besetzt. Diese können auch eine der Luteinpositionen besetzen.

Die folgende Abbildung 2-14 zeigt eine schematische Aufsicht auf den Superkomplex PS II-LHC II frei nach Boekema et al.<sup>[31]</sup>.



**Abbildung 2-14: Schematische Aufsicht von der stromalen Seite auf ein PS II-LHC II Superkomplex. S, M und L repräsentieren jeweils ein LHC II Trimer mit der Angabe der Bindungsstärke an das zentrale Photosystem. CP24, CP26 und CP29 sind periphere Lichtsammelantennen des Photosystems II.**

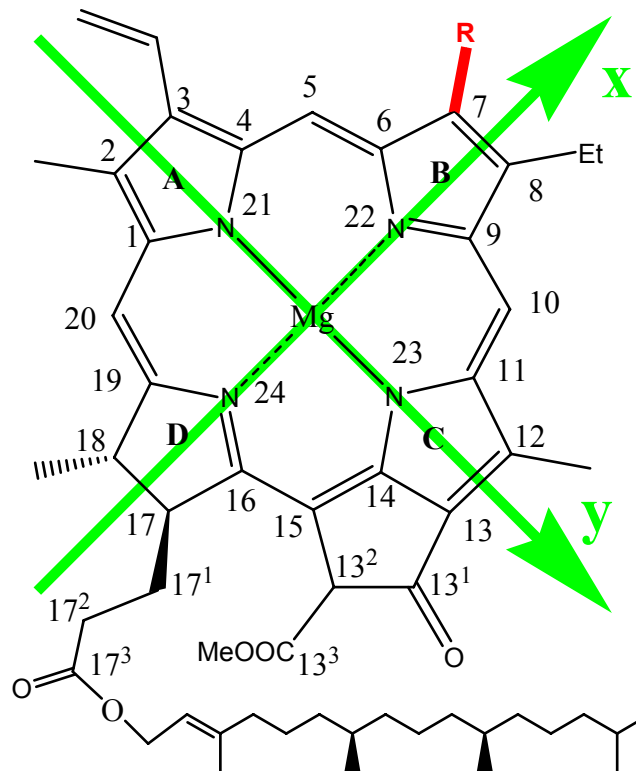
Hierbei befindet sich der Photosystem II-Kernkomplex als Homodimer in der Mitte der Abbildung, und ist von sechs Lichtsammelkomplexen II (Trimeren) sowie kleineren weiteren Lichtsammelantennen (CP29, CP26 und CP24) des Photosystems umgeben. Die Bezeichnung der Lichtsammelkomplexe II als S, M und L bezeichnet die jeweilige Bindungsstärke an das zentrale Photosystem (S = strongly bound, M = moderately bound und L = loosely bound).

## 3 Lichtsammelpigmente

### 3.1 Chlorophylle

Die wichtigsten Pigmente der Photosynthese sind die Chlorophylle. Neben ihrer Bedeutung bei der Lichtabsorption, die grüne Farbe von Blättern resultiert aus dem Absorptionsverhalten der Chlorophylle, spielen sie auch eine große Rolle bei der Energieverteilung. Durch ihre dreidimensionale Struktur verbunden mit geringen Abständen untereinander und zentralen Positionen in den Lichtsammelantennen, sind sie in der Lage, effektiv und schnell für eine Weiterleitung der aufgenommenen Energie auf der Zeitskala von Femtosekunden zu sorgen. Dieses verringert nicht nur die Wahrscheinlichkeit der Deaktivierung unter Abgabe von Wärme, sondern ermöglicht überhaupt erst den Übertrag auf andere Reaktionszentren innerhalb weniger Pikosekunden.

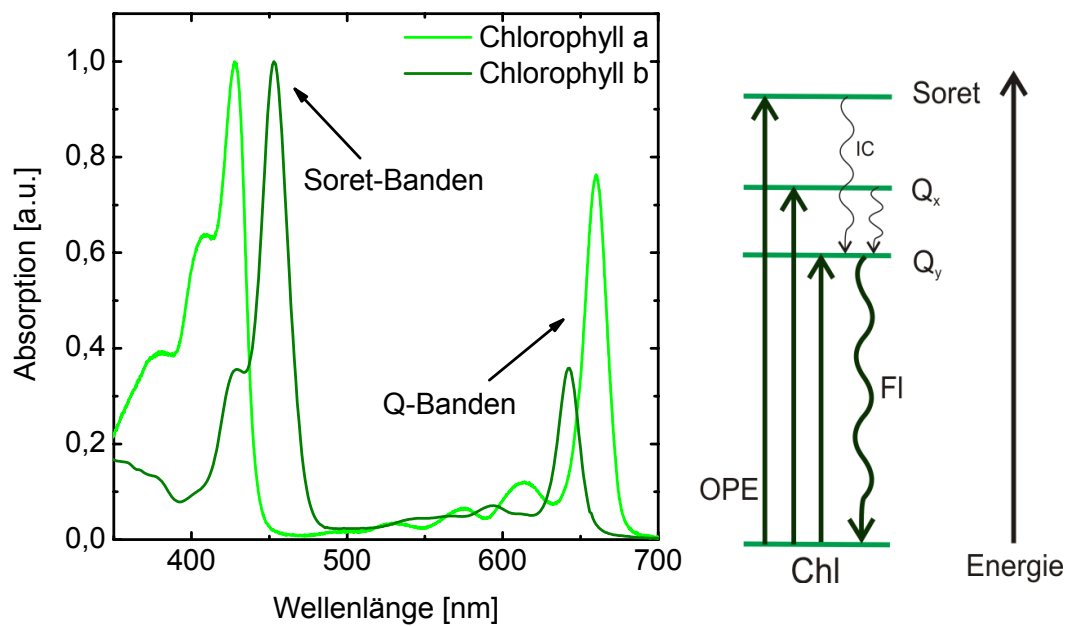
Chlorophylle bestehen aus einem Porphyrin-Grundgerüst, bei dem ein Pyrrol-Ring reduziert ist (Chlorin) und besitzen ein  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion als Zentralatom (siehe Abbildung 3-1)<sup>[15]</sup>. Fast alle besitzen die mit Phytol veresterte Säuregruppe in der 17<sup>3</sup>-Position am reduzierten Pyrrol-Ring D. Die in Pflanzen am häufigsten Chlorophylle, Chlorophyll a und Chlorophyll b, unterscheiden sich nur durch die am C-7 Kohlenstoff gebundene Gruppe R bei sonst gleichem Grundgerüst. Dieses ist eine Methylgruppe bei Chlorophyll a und eine Formylgruppe bei Chlorophyll b. Diese Vergrößerung des delokalisierten  $\pi$ -Systems führt zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums und ermöglicht damit höheren Pflanzen einen größeren spektralen Nutzungsbereich des natürlichen Sonnenlichtes. Definitionsgemäß verläuft die x- und die y-Achse in der Molekülebene, die z-Achse steht senkrecht dazu wie in Abbildung 3-1 gezeigt wird.



**Abbildung 3-1: Chlorophyll-Porphyrin Grundgerüst mit den Richtungen der x- und y-Achse<sup>[15]</sup>.  $R = CH_3$  entspricht Chlorophyll a,  $R = CHO$  entspricht Chlorophyll b.**

Die Absorptionsspektren der beiden Spezies zeigen bis auf eine Verschiebung der Banden große Ähnlichkeit, wie aus Abbildung 3-2 hervorgeht. Die wichtigsten beteiligten Energiezustände sind in der Abbildung rechts im standardisierten Energiediagramm dargestellt.

Die Übergänge im Absorptionsspektrum lassen sich nun den genannten Polarisationsrichtungen zuordnen. Die breiten Banden im „blauen“ Bereich des Absorptionsspektrums werden als Soret-Banden bezeichnet und kennzeichnen einen Singulett-Übergang  $S_0 \rightarrow S_3$  der Chlorophylle. Es sind sehr dicht beieinander liegende  $B_x$ - und  $B_y$ -Banden, die als eine breite Bande im Spektrum auftreten. Analog dazu sind Bezeichnungen wie  $Q_x$ - oder  $Q_y$ -Bande geläufig, um den „roten“ Spektralbereich des Absorptionsspektrums der Chlorophylle zu benennen. Diese gehen auf die Singulett-Übergänge  $S_0 \rightarrow S_1$  ( $Q_y$ ) sowie  $S_0 \rightarrow S_2$  ( $Q_x$ ) zurück. Der  $S_1$ -Zustand ( $Q_y$ ) von Chlorophyll a stellt somit den energetisch am tiefsten liegenden, angeregten Singulett-Zustand der Chlorophylle dar.

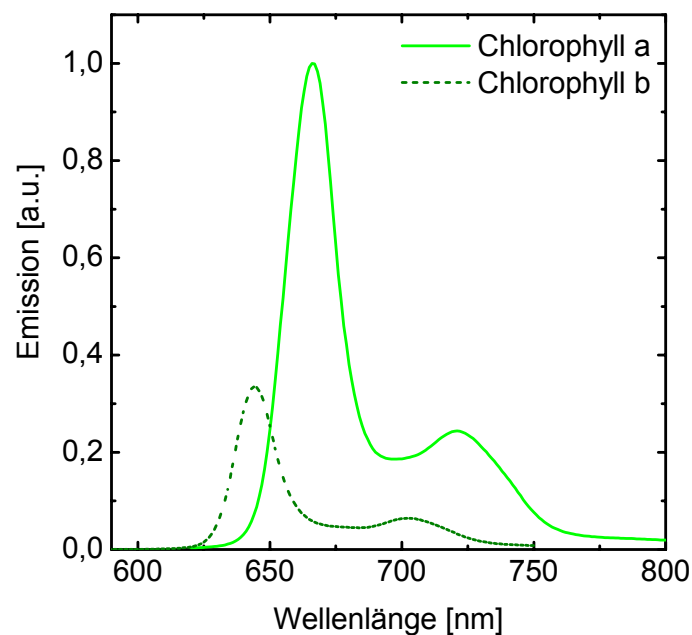


**Abbildung 3-2: Absorptionsspektren der Chlorophylle a<sup>[32]</sup>/b<sup>[33]</sup> in Diethylether. Rechts ist ein vereinfachtes Energieniveauschema des Chlorophyll a dargestellt. Erfolgt eine Anregung (OPE = one photon excitation, Einphotonenanregung) in Soret- oder  $Q_x$ -Zustände, können diese in den ersten angeregten  $S_1$ -Zustand ( $Q_y$ ) des Chlorophyll a über interne Konversion (IC) übergehen. Dieser Zustand repräsentiert den energetisch tiefliegendsten angeregten Singulett-Zustand beider Chlorophylle. Von dort aus kann ein Teil der Energie als Fluoreszenz (FI) abgegeben werden. ISC-Übergänge (Intersystem Crossing), aus denen Triplett-Zustände entstehen, wurden bei dieser Abbildung nicht berücksichtigt.**

Die aufgenommene Energie der Chlorophylle wird über den  $Q_y$ -Zustand ( $S_1$ ) an das Reaktionszentrum des jeweiligen Photosystems weitergeleitet. Parallel dazu kann sie aber auch in Form von Fluoreszenz abgegeben werden. Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz hat sich dabei als ein nützliches Hilfsmittel für die Untersuchung photosynthetischer Prozesse erwiesen<sup>[34]</sup>.

Ein Fluoreszenzspektrum der Chlorophylle a und b ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Fluoreszenz von Chlorophyll b tritt aufgrund von Energieübertragung auf den energetisch tiefer liegenden  $S_1$ -Zustand des Chlorophyll a in Lichtsammelkomplexen nicht auf und ist nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

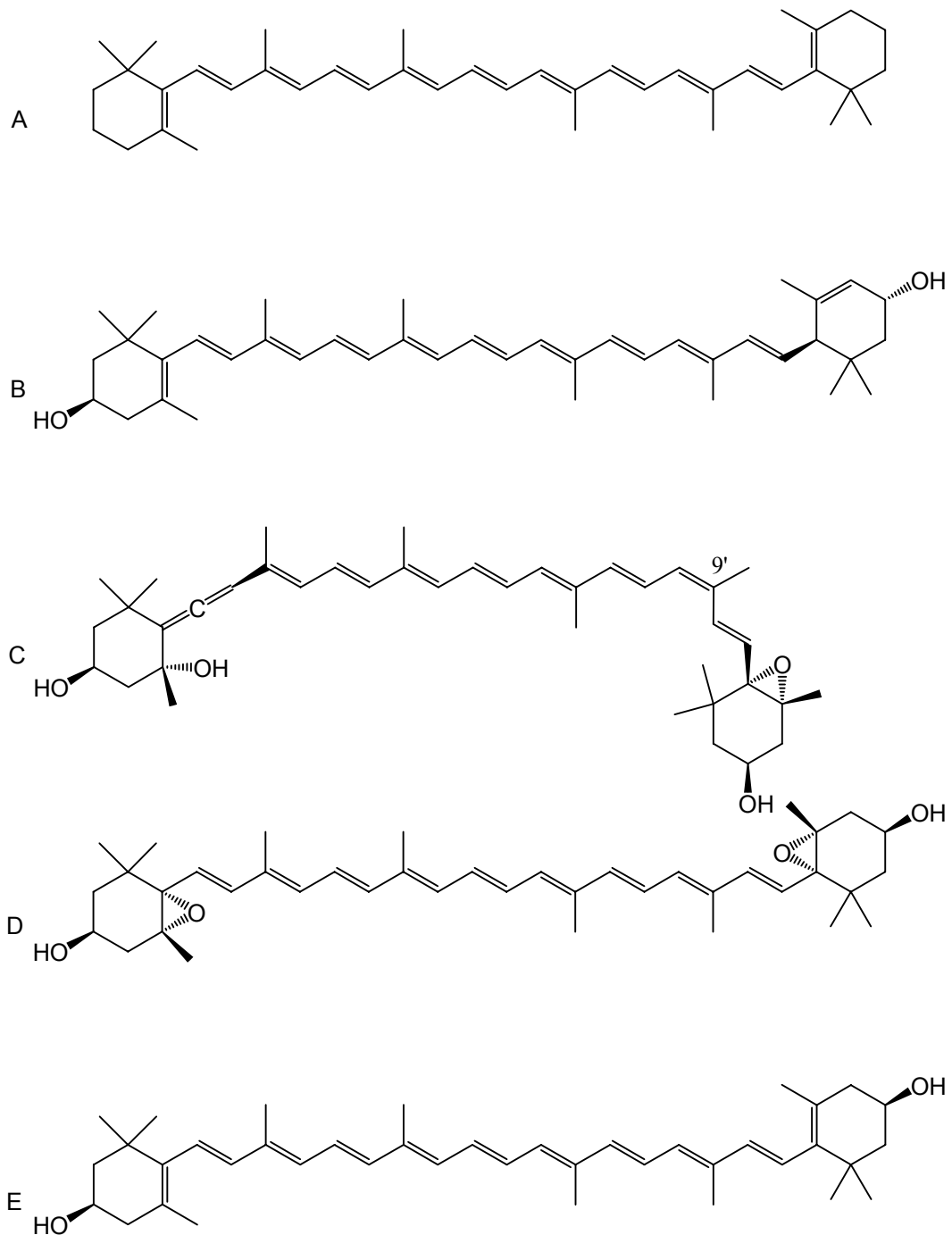




**Abbildung 3-3: Fluoreszenzspektren von Chlorophyll a/b<sup>[35]</sup> in Diethylether. Die Fluoreszenz von Chlorophyll b tritt bei Lichtsammelkomplexen nicht auf, da die Energie auf den energetisch tiefer liegenden S<sub>1</sub>-Zustand des Chlorophyll a übertragen wird.**

### 3.2 Carotinoide

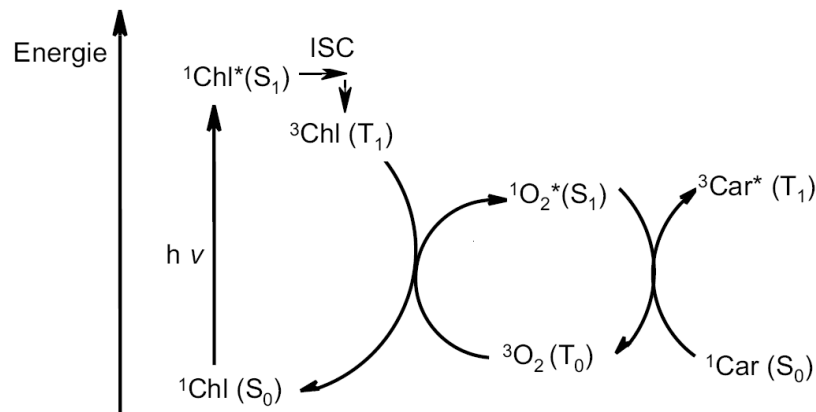
Die zweite wichtige Gruppe der photosynthetischen Pigmente sind die Carotinoide. Neben ihrer Funktion als Lichtsammelpigmente<sup>[14,36]</sup> in einem spektralen Bereich, in dem Chlorophylle nicht absorbieren, übernehmen sie wichtige Schutzfunktionen für die Photosysteme<sup>[37-40]</sup>. Sie tragen mit ihren Absorptionsbanden um 500 nm etwa mit 20-30% zur Energieaufnahme des Photosystems bei<sup>[17]</sup>. Die Vielfalt der Carotinoide lässt sich im Herbst erahnen, wenn durch Abbau der Chlorophylle die rötliche Farbe der Blätter durch die in ihnen enthaltenen Carotinoide bestimmt wird. Abbildung 3-4 zeigt die Strukturen der wichtigsten Carotinoide der pflanzlichen Photosynthese. Die Länge des konjugierten  $\pi$ -Systems variiert und kann bei einigen Carotinoiden auf konjugierte Doppelbindungen in terminalen Ringen ( $\beta$ ), oder Allensystemen (A) ausgeweitet werden. Die Lage dieser endständigen Ringe in Bezug auf die Polyenkette bestimmt die sterische Form des Moleküls und damit seine Einbau- und Reaktionsmöglichkeiten an bzw. mit Proteinen. Ist Sauerstoff im Molekül gebunden handelt es sich um ein Xanthophyll.



**Abbildung 3-4: Strukturformeln der wichtigsten Carotinoide in der pflanzlichen Photosynthese mit der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen in Klammern<sup>[15]</sup>.**  
 A =  $\beta$ -Carotin (9  $\beta$ 2) im PS I, B = Lutein (9  $\beta$ 1) im LHC II, C = Neoxanthin (9'-cis-Neoxanthin) (9 A9) im LHC II, D = Violaxanthin (9) im LHC II, E = Zeaxanthin (9  $\beta$ 2) im LHC II.

Eine wichtige Aufgabe der Carotinoide bei der Photosynthese besteht darin, entstandenen Singulett-Sauerstoff abzufangen und die Energie als Wärme abzuleiten. Durch hohe Lichtintensitäten kann es zum Intersystem Crossing (ISC) bei den Chlorophyllen kommen, wodurch Triplett-Chlorophylle entstehen. Diese erzeugen aus Triplett-Sauerstoff den stark

oxidativen Singulett-Sauerstoff. Carotinoide greifen in diesen Prozess schützend ein und verhindern somit die Bildung von Singulett-Sauerstoff. Abbildung 3-5 zeigt den Zyklus dieses Schutzmechanismus.



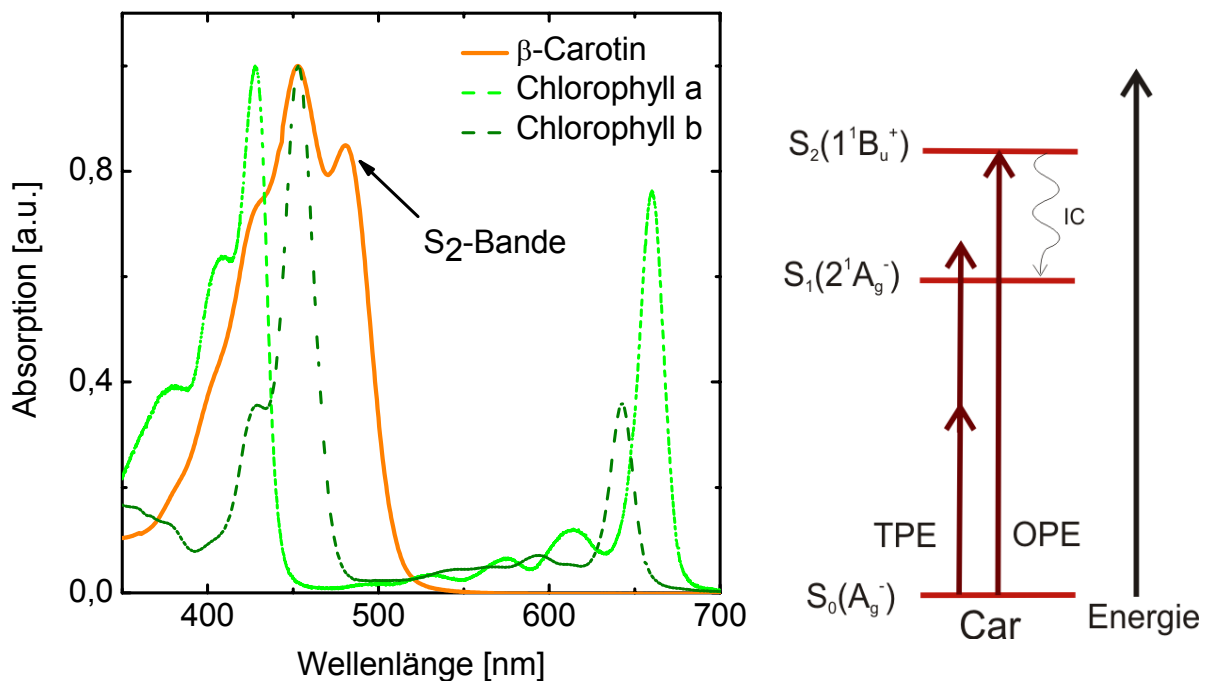
**Abbildung 3-5: Schema zur Entstehung und Abbau von Singulett-Sauerstoff durch Carotinoide bei starker Sonneneinstrahlung während der Photosynthese. (ISC = Intersystem Crossing).**

Singulett-Sauerstoff ist deutlich reaktiver (94 kJ/mol) als Triplett-Sauerstoff und führt zu einer oxidativen Schädigung. Pflanzen (Hybride) ohne Carotinoide sterben deshalb auch schnell ab.

Carotinoide können in Symmetrieüberlegungen näherungsweise als Polyene betrachtet und einer idealisierten  $C_{2h}$ -Punktgruppe zugeordnet werden. Daraus folgt, dass die beiden ersten tief liegenden, angeregten Singulett-Zustände,  $2^1A_g^-$  und  $1^1B_u^+$ , für die meisten spektroskopischen Eigenschaften der Carotinoide verantwortlich sind. Da ihr Grundzustand  $1^1A_g^-$  dieselbe Symmetrie besitzt, wie der erste angeregte Zustand  $2^1A_g^-$ , ist somit ein Einphotonenübergang nach der Laporte-Regel optisch verboten und nur der Übergang  $1^1A_g^- \rightarrow 1^1B_u^+$  optisch erlaubt<sup>[41-43]</sup>. Diese Regel gilt für alle Polyene mit einer konjugierten Kettenlänge  $N > 3$ , also für alle natürlich vorkommenden Carotinoide mit Kettenlängen zwischen 7 und 13. Im Folgenden wird der Grundzustand der Carotinoide mit  $S_0$ , der erste angeregte Singulett-Zustand mit  $S_1$  und der einphotonen-erlaubte, zweite angeregte Singulett-Zustand mit  $S_2$  bezeichnet. Abbildung 3-6 zeigt das Absorptionsspektrum von  $\beta$ -Carotin in Vergleich mit den Absorptionsspektren der beiden Chlorophylle (Chl a und Chl b). Rechts daneben ist ein Energieniveau-Diagramm dargestellt, um den Unterschied der ersten beiden angeregten Zustände zu verdeutlichen. Die optischen Anregungen erfolgen hier durch

Zweiphotonenanregung in den  $S_1$ -Zustand und durch Einphotonenanregung in den  $S_2$ -Zustand.

In der Abbildung ist die Lücke in den Absorptionsspektren der Chlorophylle um 500 nm erkennbar, in dem ausschließlich  $\beta$ -Carotin absorbiert und damit diesen spektralen Bereich des Sonnenlichtes für den Prozess der Photosynthese nutzbar macht, indem die absorbierte Energie auf die Chlorophylle übertragen wird.



**Abbildung 3-6: Absorptionsspektrum mit den photosynthetischen Pigmenten Chl a, Chl b und  $\beta$ -Carotin<sup>[44]</sup>. Die  $S_2$ -Bande um 500 nm des Carotins vergrößert den für die Photosynthese nutzbaren spektralen Bereich des Sonnenlichtes. Rechts dargestellt ist das 3-Energieniveau-Diagramm der Carotinoide. Die über Einphotonenanregung (OPE) eingestrahelte Energie kann entweder direkt aus dem  $S_2$ -Zustand auf die Chlorophylle übertragen werden, oder über den Weg der internen Konversion (IC) in den  $S_1$ -Zustand relaxieren und von dort aus übertragen werden. Die Einbeziehung des  $S_1$ -Zustandes in Prozesse der Photosynthese kann direkt über Zweiphotonenanregung (TPE) dieses Zustandes spektroskopisch verfolgt werden.**

Um die Energieübertragungswege von den Carotinoiden auf die Chlorophylle zu verstehen, muss man die Energien und Lebensdauern der beteiligten angeregten Zustände bestimmen. Mit Hilfe der von Göppert-Mayer 1931 erstmals beschriebenen Zweiphotonenanregung (TPE)<sup>[45]</sup> ist es durch die Umkehrung der Auswahlregeln möglich, direkt die  $S_1$ -Zustände der

Carotinoide anzuregen<sup>[7,9,46-48]</sup>. Dies ermöglicht eine Bestimmung der Population und Lebenszeit dieses für die Photosynthese wichtigen „dunklen“ Zustandes.

Allgemein gilt für die Zweiphotonenanregung die gleiche Resonanzbedingung wie für die Einphotonenanregung. Ein System mit zwei Niveaus der Energien  $E_e$  und  $E_g$  kann ein Photon der Energie  $E$  absorbieren, wenn gilt:

$$E = h\nu_{eg} = E_e - E_g \quad (6)$$

Nun ist die resonante Anregung aber auch möglich, wenn die Summe der Energie zweier (oder mehrerer) Photonen der des Übergangs entspricht.

$$E = h\nu_1 + h\nu_2 = E_e - E_g \quad (7)$$

Göppert-Mayer konnte in quantenmechanischer Störungsrechnung zweiter Ordnung zeigen, dass die Übergangswahrscheinlichkeit  $W$  zwischen zwei Zuständen sich wie

$$W \propto I_1 \cdot I_2 \quad (8)$$

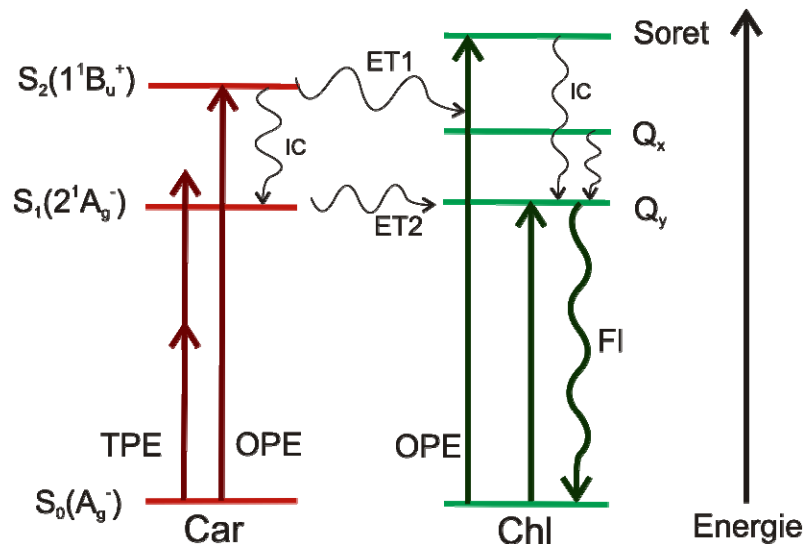
verhält, wenn  $I_1$  und  $I_2$  die Intensitäten zweier Wellenlängen sind, die die Resonanzbedingung erfüllen. Für den Fall von nur einer Anregungsquelle einer Wellenlänge gilt somit

$$W \propto I^2 \quad (9)$$

Es besteht somit eine quadratische Abhängigkeit zwischen Übergangswahrscheinlichkeit und Anregungsintensität bei einer Zweiphotonenanregung.

Das nachfolgende Energieniveau-Diagramm (Abbildung 3-7) des Photosystems I verdeutlicht die relativen Energien der beteiligten Zustände von  $\beta$ -Carotin und Chlorophyll a und veranschaulicht die möglichen Energieübertragungswege.

Der Energietransfer von Carotinoiden auf die Chlorophylle kann demnach über zwei Wege erfolgen. Direkt aus dem angeregten  $S_2$ -Zustand oder nach interner Konversion (IC) aus dem einphotonen-verbotenen  $S_1$ -Zustand.

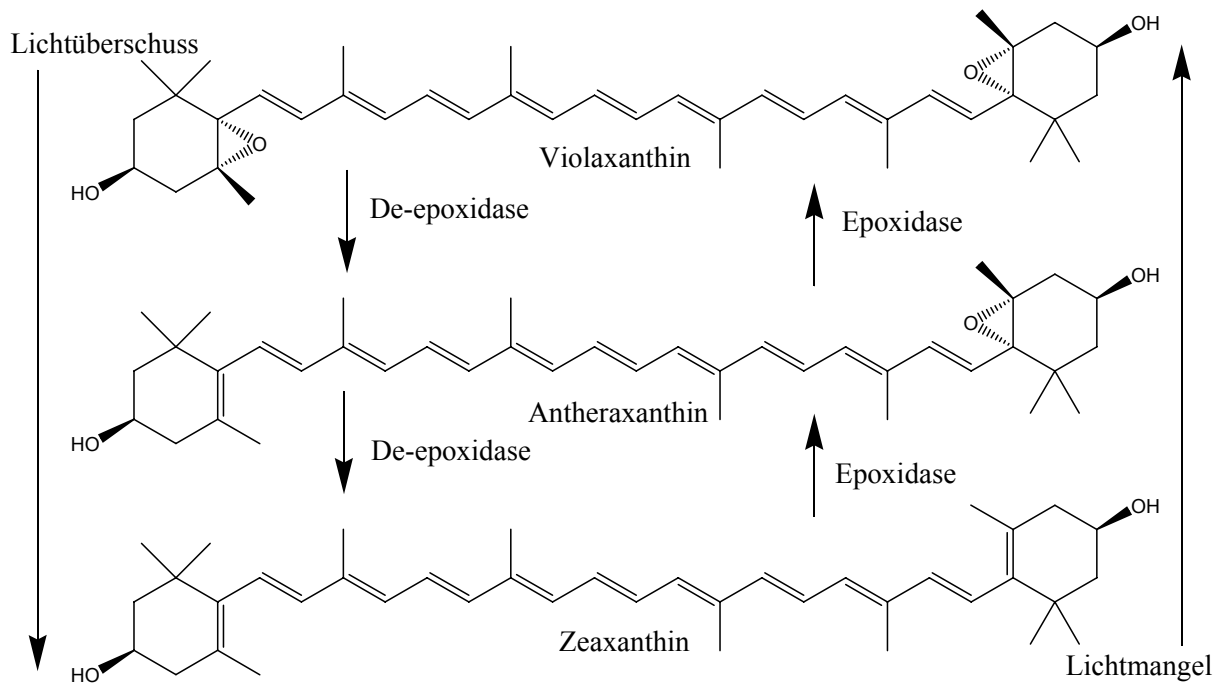


**Abbildung 3-7: Energieniveau-Schema mit Darstellung der angeregten Zustände von Carotin und Chlorophyll und den möglichen Energieübertragungswegen, ET2 und ET1 und IC (interne Konversion).**

Doch die Carotinoide sind nicht nur für das Lichtsammeln zuständig, sondern sie delegieren auch intensitätsabhängig die aufgenommene Energie in den Photosystemen. In einem Prozess, der als NPQ (nichtphotochemisches Quenching) bezeichnet wird, wird je nach Lichtintensität Energie entweder auf die Chlorophylle übertragen oder von ihnen abgeleitet. Dieses schützt Pflanzen vor einem Überschuss an Lichtenergie, welcher eine Schädigung der Pflanzen zur Folge hätte. Die Beteiligung von speziellen Carotinoiden des LHC II-Antennenkomplexes an diesem Prozess ist allgemein akzeptiert<sup>[49-53]</sup>.

In einem als Xanthophyll-Zyklus bezeichneten Kreislauf werden die Carotinoide Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin, also oxidierte Carotinoide mit Hydroxygruppen (siehe Abbildung 3-8) reversibel ineinander umgewandelt. Die Xanthophylle werden dabei in einem enzymatischen Prozess, ausgehend vom Violaxanthin bei Lichtüberschuss de-epoxidiert oder andersherum bei Lichtmangel ausgehend vom Zeaxanthin epoxidiert. Durch diesen Prozess variiert die Anzahl der konjugierten

Doppelbindungen der Xanthophylle zwischen 9 (Violaxanthin) und 11 (Zeaxanthin), wodurch es zu einer Anhebung beziehungsweise Absenkung des einphotonen-verbotenen  $S_1$ -Zustands kommt. Hierdurch kann Energie entweder von den Carotinoiden auf die Chlorophylle, oder umgekehrt, von den Chlorophyllen auf die Carotinoide übertragen werden, um von dort als Wärme abgegeben zu werden.



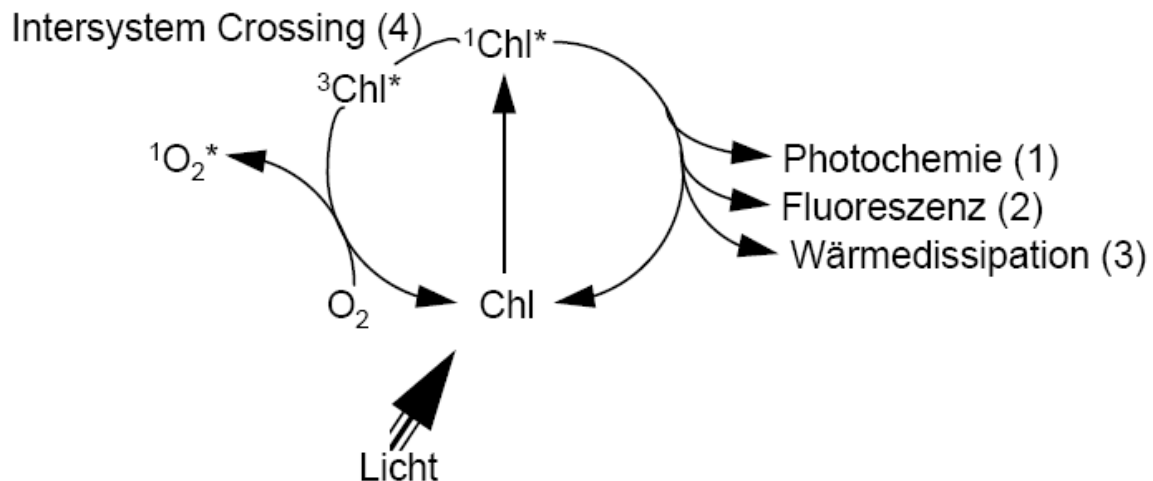
**Abbildung 3-8: Darstellung des Xanthophyll-Zyklus<sup>[49]</sup>. Die reversible Reaktion läuft intensitätsgesteuert je nach Lichteinfall bei der Photosynthese ab und verändert dadurch die Energieübertragungsprozesse zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen.**

## 4 Energie-Quenchingprozesse in Pflanzen

Die photosynthetischen Lichtsammelkomplexe und Reaktionszentren höherer Pflanzen und Grünalgen arbeiten mit so hoher Quantenausbeute, dass unter schwachen Lichtbedingungen ( $60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) nahezu jedes absorbierte Photon an die Reaktionszentren (RZ) weitergeleitet wird, wo die Ladungstrennung erfolgt.

Dabei kommt es allerdings bei hohen Lichtintensitäten schnell zu einer Sättigung der Reaktionszentren, das heißt, sie können die absorbierte Energie nicht weiter aufnehmen. Um schädliche oxidative Nebenprozesse zu unterbinden, kann die Überschussenergie effizient als Wärme abgeleitet werden. Dieser Prozess wird als nichtphotochemisches Quenching

bezeichnet und ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden verschieden Konzepte vorgestellt, wie die Anregungsenergie gefahrlos abgeleitet, d.h. gequenchet werden kann. Als häufig genutzte Messgröße dient hierbei die Chlorophyll-Fluoreszenz, die mit anderen Relaxationsprozessen der angeregten Chlorophylle, wie in Abbildung 4-1 gezeigt, in folgendem Zusammenhang steht.



**Abbildung 4-1: Relaxationswege angeregter Chlorophyllmoleküle<sup>[40]</sup>. Die Prozesse eins, zwei und drei sind direkt voneinander abhängig. Der Prozess der Wärmedissipation (3) beinhaltet hierbei den Prozess des nichtphotochemischen Quenchings.**

Die Fluoreszenzemission macht dabei allerdings nur einen Bruchteil von 0,6-3% der gesamten absorbierten Energiemenge aus<sup>[54,55]</sup>. Da sie aber gut zu erfassen ist, wurde sie in den letzten Jahren zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Beschreibung der Effizienz der Photochemie und der Wärmedissipation<sup>[56,57]</sup>.

Bezogen auf Fluoreszenzmessungen wird davon gesprochen, dass sowohl Photochemie als auch Wärmedissipation die Fluoreszenzausbeute mindern, also die Fluoreszenz löschen (quenchen). Das Gesamtquenching setzt sich daher aus der Summe aus photochemischen Quenching (qP) und nichtphotochemischen Quenching (qN bzw. NPQ) zusammen. Besonderes Interesse gilt dabei der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung. Mit ihr lässt sich die thermische Dissipation überschüssiger Anregungsenergie bestimmen. Das nichtphotochemische Quenching qN ist hierbei definiert als die Summe der drei Koeffizienten qE, qI und qT:

- qE ist energieabhängiges Quenching und wird induziert durch einen starken pH-Gradienten innerhalb der Thylakoidmembran unter Starklichteinfluss<sup>[58]</sup>. Ein dadurch



resultierender pH-Wert  $< 6$  im Lumen von intakten Chloroplasten aktiviert das Enzym Violaxanthin-deepoxidase<sup>[59,60]</sup> (VxDE), das gezielt und reversibel das Carotin Violaxanthin über Antheraxanthin in Zeaxanthin überführt (siehe Abbildung 3-8). Diese Umwandlung, die als Xanthophyll-Zyklus bekannt ist, bewirkt einerseits Konformationsänderungen in den Lichtsammelkomplexen, durch die Anregungsenergie als Wärme abgeführt werden kann<sup>[61-64]</sup>, andererseits auch eine Vergrößerung des konjugierten Systems der beteiligten Carotinoide. Dadurch werden die beteiligten angeregten Zustände energetisch angehoben, oder abgesenkt und es kann zu einer Umkehr des Energietransfers zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen kommen<sup>[65]</sup>.

- qI ist definiert als Quenching durch Photoinhibition bedingt durch extreme Lichtintensitäten bzw. extremen Lichtstress der Pflanze. Aro et al. zeigten, dass die Ursache hierbei in der Deaktivierung des D1-Proteins im PS II liegt<sup>[66]</sup>.
- qT definiert state-transition Quenching und beinhaltet Quenching-Mechanismen die durch Umoorientierung beweglicher Lichtsammelkomplexe zwischen PS I und PS II ablaufen und eine Verkleinerung des Absorptionsquerschnittes der Lichtsammelantennen bewirken<sup>[67-70]</sup>. Diese Quenching-Mechanismen spielen allerdings nur bei geringen Lichtintensitäten eine wesentliche Rolle<sup>[71-73]</sup> und können daher in der hier vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden.

Ein allgemeines Modell für die Berechnung der Quenching-Koeffizienten  $q_{SV}$  wurde von Govindjee et al veröffentlicht<sup>[74,75]</sup>. Es basiert auf einem Stern-Volmer Mechanismus:

$$q_{SV} = \frac{\Delta F}{F} = \frac{(F_M - F)}{F} = \frac{F_M}{(F - 1)} \quad (10)$$

$F_M$  bezeichnet hierbei die maximale Chlorophyll a Fluoreszenzintensität die entsteht, wenn Pflanzen nach Dunkeladaption der Photosysteme (ca. 30 min) mit einem kurzen Lichtpuls sättigender Intensität bestrahlt werden.  $F$  bezeichnet die Chlorophyll a Fluoreszenzintensität im gequenchten Zustand. In der Theorie ist der Quotient aus  $\Delta F/F$  linear korreliert mit der Konzentration eines diffusen Quenchers.

## 5 Energieübertragungsprozesse

Die Photosynthese ist durch die Anordnung der Lichtsammelkomplexe in Verbindung mit den Photosystemen deshalb so effektiv, da die von den Pigmenten absorbierte Energie von außen zu den zentral gelegenen Reaktionszentren in den Photosystemen weitergeleitet wird (siehe Abbildung 2-14). Um die dazu notwendigen Entfernungen von bis zu einigen hundert Ångström zurückzulegen, wird die Energie von Pigment zu Pigment übertragen. Die Geschwindigkeit der Energieübertragung muss hierbei wesentlich größer sein, als die Lebenszeit der angeregten Zustände der beteiligten Pigmente.

Für das Verständnis von Prozessen der Energieübertragung zwischen Pigmenten wurden schon früh Theorien aufgestellt: Im Jahr 1947 von T. Förster<sup>[76]</sup> und fünf Jahre später (1952) eine Erweiterung durch Dexter<sup>[77]</sup>. Der einfachste Fall einer Energieübertragung ist der Strahlungsübergang, bei dem ein Donormolekül Photonen emittiert, die danach von einem Akzeptormolekül absorbiert werden. Dieser Übergang ist unabhängig von Interaktionen der beiden Moleküle. Doch der Energietransfer zwischen zwei Molekülen kann nicht nur über diese triviale (Re-)Absorption von emittierten Photonen oder durch Stöße stattfinden, sondern auch strahlungslos. Nach Fermis Goldener Regel wird der dafür wichtige Kopplungsterm  $V$  mit der spektralen Überlappung von Donor und Akzeptor in die Energietransferraten  $k_{ET}$  umgerechnet.

$$k_{ET} = \frac{1}{\hbar^2 c} |V|^2 J_{AD} \quad (11)$$

Die spektrale Überlappung  $J_{AD}$  ist definiert als das Integral des Produktes aus den auf die Fläche eins normierten Emissions- bzw. Absorptionsspektren  $f_D(\nu)$  und  $\varepsilon_A(\nu)$ .

$$J_{DA} = \int_0^\infty (f_D(\nu) \cdot \varepsilon_A(\nu)) d\nu \quad (12)$$

Abhängig vom Abstand der Donor- und Akzeptormoleküle und der Stärke der Kopplung wurden zwei verschiedene Mechanismen postuliert:

- Förster-Energietransfer für schwächere Kopplungen bei größeren Abständen ( $>20 \text{ \AA}$ ) basierend auf Dipol-Dipol Wechselwirkungen (Coulombsche Wechselwirkungen).
- Dexter-Energietransfer für starke Kopplungen bei kleinen Abständen ( $<20 \text{ \AA}$ ) durch Einbeziehung eines Elektronenaustauschterms in die Kopplung.

Bei dem Förster-Mechanismus hängt das Potential zwischen den beiden Dipolen von dem Übergangsdipolmoment der beiden Spezies (Akzeptor  $\mu_A$ , Donor  $\mu_D$ ), dem Abstand  $r$ , dem Orientierungsfaktor  $\kappa$  und dem Brechungsindex  $n$  des dielektrischen Mediums ab:

$$V = \frac{1}{n^2} \kappa \frac{\mu_A \mu_D}{r^3} \quad (13)$$

Der Orientierungsfaktor  $\kappa$  setzt sich dabei folgendermaßen zusammen:

$$\kappa = \cos(\phi_{DA}) - 3\cos(\phi_D) \cdot \cos(\phi_A) \quad (14)$$

Hierbei bezeichnet  $\phi_{DA}$  den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Moleküle und  $\phi_D$  bzw.  $\phi_A$  die Winkel zwischen diesen Vektoren und der direkten Verbindungslinie zwischen Donor und Akzeptor. In einer hinreichend viskosen Lösung lässt sich  $\kappa$  über alle Orientierungen mitteln und liefert nach Integration einen Mittelwert von  $\langle \kappa^2 \rangle = \frac{2}{3}$ . Der üblicherweise verwendete Ausdruck für die Rate des Förster-Energietransfers ist definiert als:

$$k_{ET} = \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \cdot \tau_D^{-1} \quad (15)$$

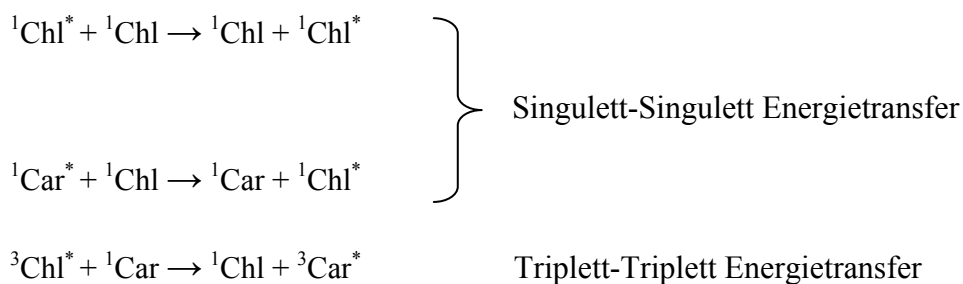
Dabei ist  $\tau_D$  die Lebenszeit des Donors und  $r$  der Abstand zwischen den Chromophoren.  $R_0$  ist der Förster-Radius und entspricht der Strecke, bei der die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers bei 50% liegt.

Der Dexter-Energietranfer ist eine Erweiterung der Förster-Theorie und erweitert den Kopplungsterm  $V$  aus Fermis Goldener Regel um einen Elektronenaustauschterm. Dafür sind allerdings direkte Überlappungen der Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor erforderlich, was den Abstandsspielraum zwischen Donor und Akzeptor stark einschränkt. Es ergibt sich, bedingt durch den exponentiellen Abfall der Elektronen-aufenthaltswahrscheinlichkeit bei nicht zu kleinen Abständen, folgende Abhängigkeit für den Dexter-Energietransfer:

$$k_{ET} = KJ_{DA} \exp(-2r_{DA}/L_{DA}) \quad (16)$$

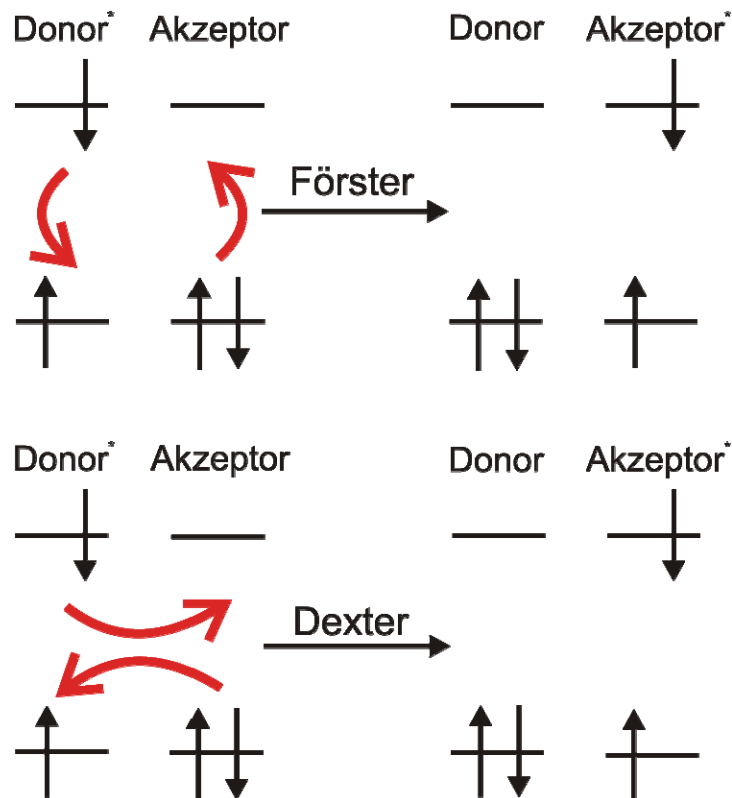
Hierbei beschreibt  $K$  spezielle Orbitalwechselwirkungen,  $J_{DA}$  das Überlappungsintegral,  $r_{DA}$  den Donor-Akzeptor-Abstand und  $L_{DA}$  die Summe der van der Waals Abstände.

Neben dem Abstandsunterschied für den Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor in beiden Modellen ist ein weiterer großer Unterschied der Elektronentransfer der Dexter-Theorie selbst. Durch ihn werden auch Übergänge erlaubt, die symmetrie- und spinverboden sind, solange sich der Spin der Wellenfunktion des gesamten Donor-Akzeptor-Komplexes nicht ändert. Die folgenden Reaktionen zeigen die relevanten photosynthetischen Energieübertragungswege:



Eine Zuordnung der hier vorgestellten Theorien zu den jeweiligen Übertragungswegen könnte anhand der Auswahlregeln nun theoretisch geschehen (Singulett-Singulett-Energieübertragungen hauptsächlich mittels Förster-Energietransfer, Triplett-Triplett-Energietransfers durch Dexter-Energietransfer). Hierdurch wird eine räumliche Zuordnung der Carotinoide zu

speziellen Funktionen in den Photosystemen möglich. Abbildung 5-1 zeigt schematisch noch einmal die Unterschiede der beiden Übertragungsmechanismen.



**Abbildung 5-1: Vergleich der Energieübertragungsmechanismen nach Förster und Dexter<sup>[78]</sup>.**

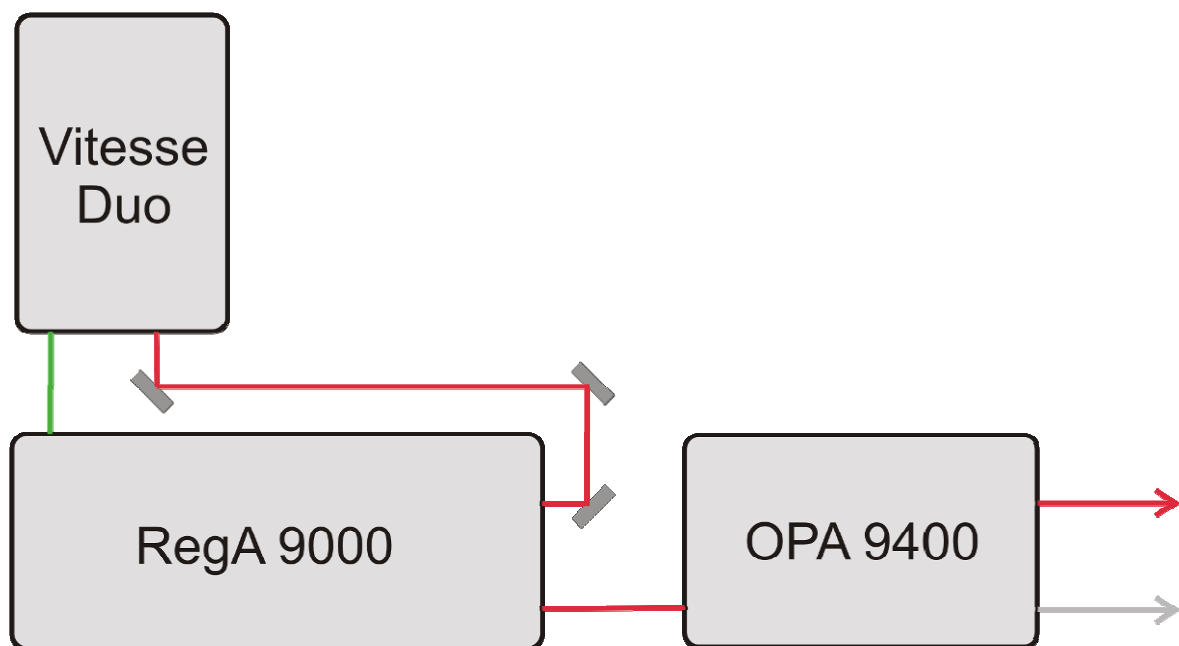
Singulett-Singulett Energieübertragungen zwischen Chlorophyllen laufen in der Photosynthese also vorwiegend nach einem Förster-Mechanismus ab<sup>[79]</sup>. Probleme bei der Beschreibung von Energieübergängen zwischen den Pigmenten treten für Car  $S_1 \rightarrow S_0$  Chl a Übergänge auf, die nach der Förster-Theorie verboten sind, da ihr Übergangsdipolmoment null ist. Abhilfe schafft hier die Einbeziehung von Multipolwechselwirkungen bzw. Vermischung der  $S_1$ - und  $S_2$ -Zustände des Carotins in den Energietransfer<sup>[79,80]</sup>. Energieübertragung bei der Photosynthese nach dem Dexter-Mechanismus läuft bei den Schutzprozessen der Carotinoide ab, bei denen Energie aus Triplett-Chlorophyll- und Singulett-Sauerstoff-Zuständen auf die Carotinoide übertragen wird<sup>[17]</sup>.

## 6 Experimenteller Aufbau

### 6.1 Das Lasersystem

Das für alle Experimente verwendete Ultrafast-Lasersystem ist ein kommerziell erhältliches System der Firma Coherent und besteht aus folgenden Komponenten (Abbildung 6-1):

- Vitesse Duo (kombinierter Pumplaser und Oszillator)
- RegA 9000 (regenerativer Verstärker)
- OPA 9400 (optisch-parametrischer Verstärker)

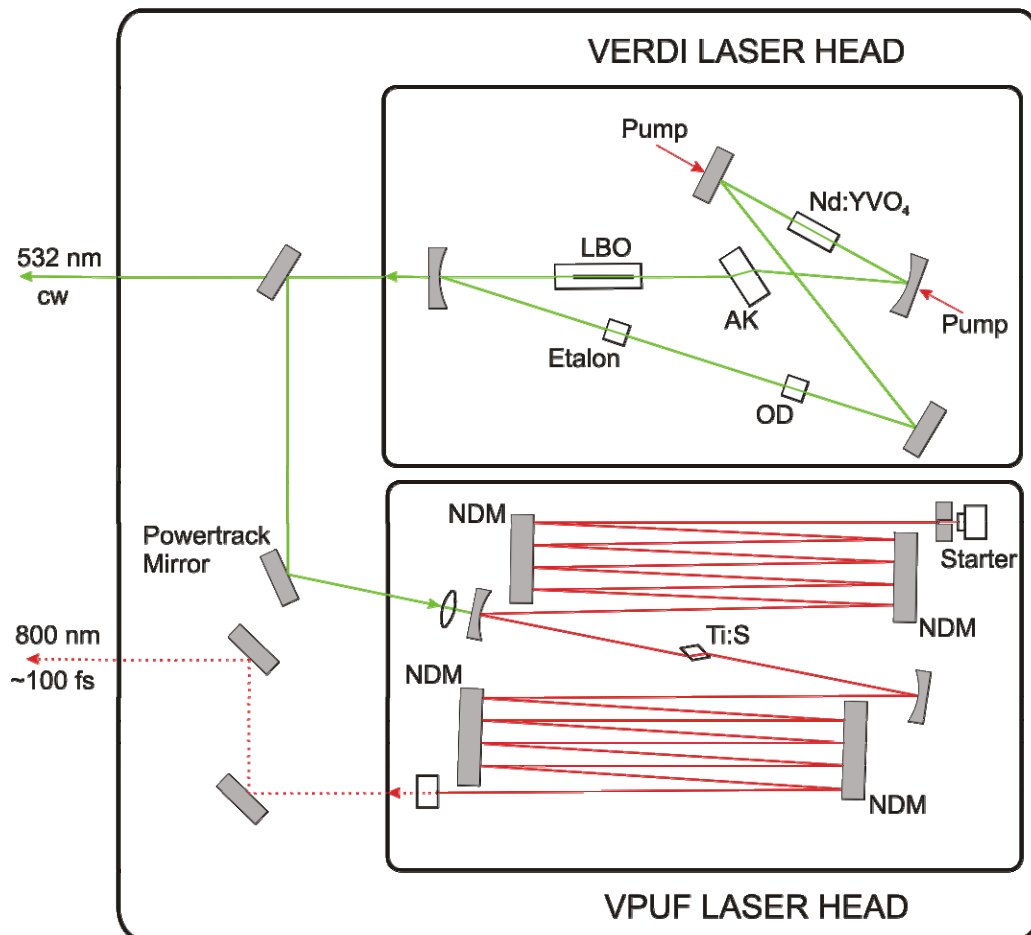


**Abbildung 6-1: Schematischer Aufbau des drei-Komponenten Lasersystems der Firma Coherent.**

Durch Kombination dieser drei Komponenten steht experimentell ein breites Spektrum von Wellenlängen im Bereich von 500-700 nm und 900-2400 nm zur Verfügung. Das gesamte System ist auf einem schwingungsentkoppelten Lasertisch (NRC, Newport) montiert. Zum Schutz vor Staub wird es permanent mit gereinigter Luft einer Flowbox umspült.

### 6.1.1 Vitesse Duo

Der Vitesse Duo Laser ist ein gekoppeltes System (siehe Abbildung 6-2) bestehend aus dem eigentlichen Pumplaser, einem Verdi und einem Ultrafast Oszillator (VPUF)<sup>[81]</sup>.



**Abbildung 6-2: Schematischer Aufbau des Vitesse Duo Systems, bestehend aus einem Vanadat-Pumplaser (Verdi) kombiniert mit einem passiv-modengekoppelten Ti:Saphir Oszillator, der Femtosekundenpulse mit einer Wellenlänge um 800 nm erzeugt<sup>[81]</sup>.**

Der Verdi besteht aus einer Ringkavität, die von zwei Laserdiodenbanken optisch mit 808 nm ( $12.376 \text{ cm}^{-1}$ ) gepumpt wird und Nd:YVO<sub>4</sub> (im Folgenden als Vanadat bezeichnet) als aktives Medium enthält. Vanadat besitzt gegenüber anderen Lasermedien den höchsten Absorptionskoeffizienten für 808 nm sowie einen sehr hohen Wirkungsquerschnitt für die schmalbandige stimulierte Emission bei 1064 nm ( $9.398,5 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[81,82]</sup>. Diese wird mit Hilfe eines temperierten LBO-Kristalls (LiB<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) auf 532 nm ( $18.797 \text{ cm}^{-1}$ ) frequenzverdoppelt. Da sich die Fundamentalwelle im 90° Winkel zur optischen Achse fortpflanzt, kann die winkelabhängige Phasenanpassung temperaturabhängig eingestellt werden. Diese beträgt für

die Frequenzverdopplung von 1064 nm auf 532 nm genau 148°C. Weiterhin sind in der Ringkavität eine optische Diode, welche unidirektionalen Betrieb gewährleistet, und ein Etalon verbaut. Dieser filtert mit Hilfe des Effektes der destruktiven Interferenz während des Betriebes ungewollte Longitudinalmoden heraus. Mit Hilfe eines Strahlteilers wird nun ein Teil der 532 nm Welle über einen leistungssensitiven Einkoppelspiegel in den Oszillator fokussiert. Der Oszillator ist ein passiv modengekoppelter Titan-Saphir-Laser. Das Laser-Medium, Titan:Saphir ( $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ ), ist in einem Wellenlängenbereich von 680 nm bis 1100 nm laseraktiv und hat sein Verstärkungsmaximum bei ca. 810 nm. Im Experiment wird der Oszillator bei 800 nm betrieben. Die passive Modenkopplung wird durch den optischen Kerr-Effekt erreicht<sup>[83]</sup>. Dieser beruht darauf, dass der Brechungsindex, in diesem Fall der des Ti:Saphir-Kristalls, einen nichtlinearen Anteil besitzt, wodurch er für höhere Intensitäten steigt. Dadurch entsteht an einer Stelle des Strahls im Resonator eine Taille, die für höhere Intensitäten schmaler wird (Selbsfokussierung) und in Kombination mit einem variablen Spalt die Moden-Kopplung erst möglich macht. Ist der Spalt ganz offen, so erfolgt dort unabhängig von der Lichtintensität keine Absorption, und der Oszillator läuft im Dauerstrich-Betrieb (CW-Mode). Ist der Spalt jedoch halb geschlossen, wird nur das Intensitätsmaximum ungehindert durchgelassen, wodurch die Blende als sättigbarer Absorber wirkt und Femtosekundenpulse wegen ihrer höheren Intensität gegenüber einer Dauerstrich Mode begünstigt, was so zu dem gewünschten Pulsbetrieb führt.

Zur Modenkopplung kommt es allerdings nur, wenn durch Intensitätsfluktuationen ein für den Kerr-Linsen-Effekt ausreichendes Maximum auftritt, aus dem sich ein Femtosekundenpuls bilden kann. Deswegen ist in der Oszillatorkavität ein so genannter „Starter“ eingebaut, der nach Anlegen einer hochfrequenten Spannung Modulationen der Resonatorlänge hervorruft und so Intensitätsfluktuationen erzeugt. Nach dem Einsetzen des Pulsbetriebs wird der Starter automatisch abgeschaltet.

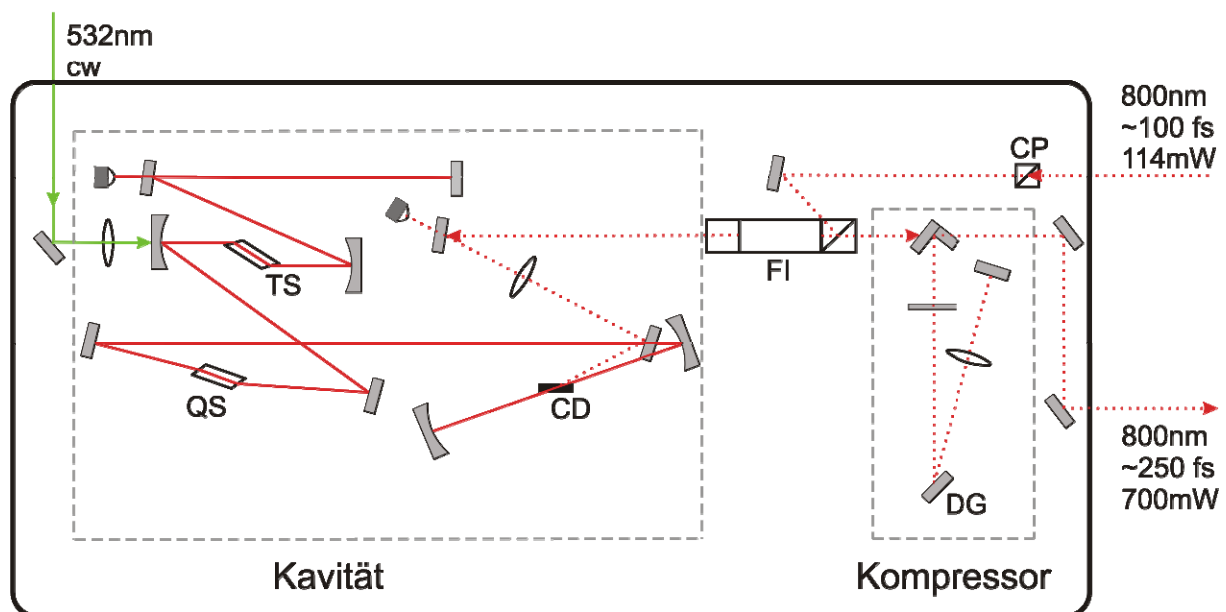
Die normale Dispersion von Ti:Saphir führt dazu, dass langwelligeres Licht den Kristall schneller durchläuft. Bei der durch das Zeit-Bandbreiten-Produkt gegebenen, nicht zu vernachlässigenden, spektralen Breite der Femtosekundenpulse würde dies zu einem Auseinanderlaufen der Pulse, einem so genannten (positiven) Chirp führen (die Wellenlänge ist am Anfang des Pulses größer als am Ende), wenn die Dispersion nicht kompensiert würde. Dies geschieht durch die dispersiven dielektrischen Spiegel (NDM) des Resonators, welche die optische Weglänge für die langwelligeren Anteile des Puls-Spektrums vergrößern.



Da im Pulsbetrieb ein einziger Femtosekundenpuls im Resonator hin- und herläuft, wird die Repetitionsrate des Oszillators über die Resonatorlänge bestimmt ( $l = 1,87 \text{ m}$ ) und beträgt  $c/(2l) = 80 \text{ MHz}$ . Die Ausgangsleistung des Oszillators beträgt ca.  $110 \text{ mW}$ , was einer Pulsenergie von  $1,4 \text{ nJ}$  entspricht. Spektrum und zeitliches Profil der Pulse sind Gauss-förmig mit einer Halbwertsbreite unter  $100 \text{ fs}$ .

### 6.1.2 RegA 9000

Der RegA 9000 ist ein regenerativer Verstärker, welcher die vom Vitesse Duo emittierten Femtosekundenpulse („seed beam“) über einen weiten Bereich intensitätsunabhängig verstärkt<sup>[84]</sup>. Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 6-3 dargestellt.



**Abbildung 6-3: Strahlengang im regenerativen Verstärker RegA 9000.** Der Verstärker besitzt zwei aktive optische Bauteile (akusto-optische Modulatoren): den Güteschalter (QS = Q-Switch) und den Ein-/Ausschalter (CD = cavity dumper). Das Verstärkermedium ist wiederum ein Ti:Saphir Kristall, der mit  $10 \text{ W}$  bei  $532 \text{ nm}$  vom Vitesse Duo optisch gepumpt wird. Im System ist ein Gitterkompressor integriert, der die durch den Verstärkungsprozess positiv gechirpten Pulse auf ca.  $220 \text{ fs}$  Halbwertsbreite komprimiert<sup>[84]</sup>.

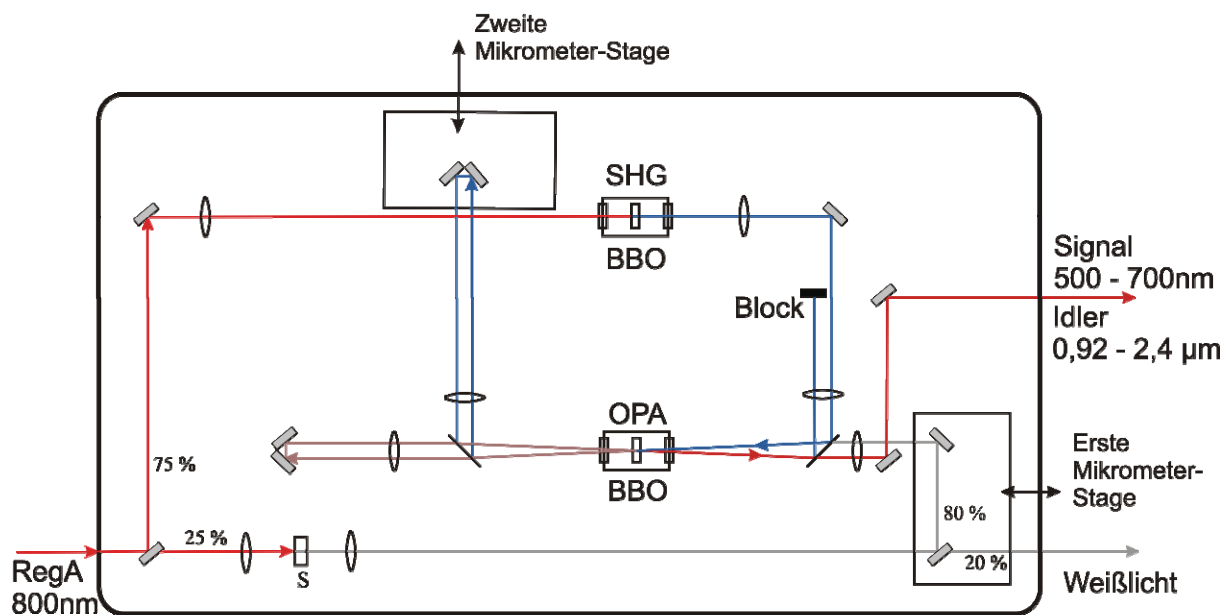
Auch im regenerativen Verstärker ist das Verstärkermedium ein Titan-Saphir Kristall, welcher durch den kontinuierlichen  $10 \text{ W}$  Laserstrahl bei  $532 \text{ nm}$  aus dem Vitesse Duo System gepumpt wird. In dem Kristall wird die zur Verstärkung des Femtosekundenpulses

benötigte Energie gespeichert. Damit sich die Besetzungsinversion im Ti-Saphir Kristall aufbauen kann („regenerieren“, daher der Name), muss unerwünschtes Lasen in der Kavität verhindert werden, was durch den integrierten Güteschalter (Q-Switch) erreicht wird. Beim Q-Switch handelt es sich um einen akusto-optischen Modulator, welcher einen Tellurdioxid ( $\text{TeO}_2$ ) Kristall verwendet, in dem durch akustische Signale ein optisches Gitter erzeugt wird. In der Kavität vorhandene Strahlen werden durch dieses Gitter abgelenkt, solange der Q-Switch durch akustische Signale gespeist wird, so dass es bis zum Ausschalten nicht zum Lasen kommen kann. Nach dem Abschalten des Güteschalters wird über den Ein-/Ausschalter (Cavity Dumper) ein Femtosekundenpuls mittels Beugung in den Resonator eingekoppelt. In ihm läuft er ca. 20-35-mal hin und her und wird bei jedem Durchgang durch den Ti:Saphir Kristall verstärkt. Wenn die im Kristall gespeicherte Energie übertragen wurde, erreicht der Puls eine Sättigung und wird durch den Cavity Dumper wieder aus der Kavität hinausgebeugt und der Vorgang wiederholt sich. Um zu verhindern, dass die verstärkten Pulse denselben Weg nehmen, wie die eingehenden, werden sie mit Hilfe eines Faraday-Isolators getrennt. Der magneto-optische Faraday-Effekt bewirkt polarisationsabhängig, dass die seed-beam Pulse reflektiv in die Kavität eingekoppelt werden, die verstärkten Pulse hingegen transmittiv passieren können. Der regenerative Verstärker wird mit einer Repetitionsrate von 125 kHz betrieben, das heißt es wird nur jeder 640te Puls verstärkt.

Da der RegA 9000 schon bestehende Femtosekundenpulse verstärkt, ist ein Auseinanderlaufen der Pulse (positiver Chirp) hier nicht hinderlich, sondern im Gegenteil sogar erwünscht, da die sonst zu hohen Spitzenintensitäten im fokalen Bereich den Ti:Saphir Kristall zerstören würden. Deshalb wurde mit  $\text{TeO}_2$  als Material für den Güteschalter speziell ein extra hoch-dispersives Material verwendet. Die verstärkten Pulse werden hierdurch bis zu dem Auskoppeln aus der Kavität auf eine Halbwertsbreite von ca. 20-30 ps zeitlich verbreitert. Durch den integrierten Pulskompressor werden diese durch negative Dispersion (die langwelligeren Anteile des Pulses legen eine längere Wegstrecke zurück als die kurzwelligeren) auf 220 fs komprimiert. Die längere Pulsdauer im Vergleich zu den Oszillator-Ausgangspulsen liegt hauptsächlich an höheren Ordnungen des Chirps, die mit dem Kompressor nicht komprimiert werden können. Die Ausgangsleistung des regenerativen Verstärkers liegt bei 620 mW, was einer pro Pulsenergie von 5  $\mu\text{J}$  entspricht (bei 125 kHz Repetitionsrate).

### 6.1.3 Optical Parametric Amplifier (OPA)

Nach der Verstärkung beträgt die zentrale Wellenlänge der Pulse ca. 800 nm. Der optisch-parametrische Verstärker (OPA) dient dazu, kontinuierlich durchstimbare Pulse in einem weiten Bereich des sichtbaren und nahen infraroten Spektrums zu erzeugen<sup>[85]</sup>. Abbildung 6-4 zeigt seinen schematischen Aufbau.



**Abbildung 6-4: Strahlengang im optisch-parametrischen Verstärker (OPA 9400). Durch Frequenz-konvertierende Prozesse entstehen aus den 800 nm Pulsen des RegA zuerst Weißlicht- und frequenzverdoppelte Pulse (400 nm). In einem weiteren Schritt entstehen „Signal“- und „Idler“-Pulse, deren Wellenlängen durch den Winkel des OPA-Kristalls sowie den Positionen der beiden Mikrometer-Stages bestimmt werden<sup>[85]</sup>.**

Die Prozesse, die innerhalb des OPAs ablaufen, sind „passive“ Frequenz-konvertierende Prozesse, die im Gegensatz zu den vorhergehenden Stufen des Lasersystems nicht elektronisch gesteuert werden.

Im OPA wird der aus dem RegA kommende Pulszug zunächst durch einen dielektrischen Strahlteiler im Verhältnis eins zu drei geteilt.

Der kleinere Anteil der RegA Ausgangsleistung wird in ein Saphirplättchen fokussiert, in dem es zur Weißlichterzeugung kommt. Durch die hohe fokale Intensität und die Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex von Saphir kommt es zu Prozessen der Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation, durch die der Puls kontinuierliche spektrale

Anteile von ca. 460-1000 nm enthält. Trotz des Intensitätsmaximums des Weißlichtspektrums bei 800 nm erscheint dem menschlichen Auge der Puls weiß. Der Weißlicht-Puls besitzt einen starken positiven Chirp, das heißt, die „roten“ Anteile des Spektrums befinden sich am Anfang des Pulses, die „blauen“ Anteile am Ende.

Der größere Teil des eingehenden 800 nm Pulses wird in einen Beta-Barium-Borat (BBO) Kristall fokussiert, in welchem es zu einer Frequenzverdopplung des Pulses kommt, so dass der ursprüngliche 800 nm Puls zu einem Puls mit einer Wellenlänge von 400 nm konvertiert wird.

Sowohl der Weißlicht-Puls, als auch der frequenzverdoppelte 400 nm Puls werden von den Resten der 800 nm Grundwellenlänge getrennt und überlagert in einen zweiten BBO-Kristall fokussiert, in welchem es zu der erwünschten parametrischen Verstärkung kommt. Nach dem Durchgang durch den BBO-Kristall werden die Pulse durch einen dielektrischen Spiegel getrennt und über eine zweite Mikrometer-Stage bzw. Retroreflektoren erneut im OPA vereinigt, so dass die parametrische Verstärkung ein zweites Mal stattfinden kann. Nach dem zweiten Durchgang werden Signal und Idler durch einen dielektrischen Spiegel vom Pumpstrahl getrennt und über einen weiteren Spiegel aus dem OPA ausgekoppelt.

Beim OPA-Prozess handelt es sich um einen iterativen Prozess der Differenzfrequenz-Erzeugung. Abhängig vom Anstellwinkel des OPA-Kristalls wird ein bestimmter Teil des Weißlicht-Spektrums verstärkt (daher der Name "parametrische Verstärkung"). Dabei wird eine über die Stellung der ersten Mikrometer-Stage wählbare Frequenz des Weißlichtes (der so genannten *Signal* Frequenz) mit dem 400 nm Puls überlagert (*Pump* Frequenz), wodurch es zur Erzeugung einer dritten Frequenz kommt (*Idler* Frequenz), welche der Differenz von Signal- und Pumpfrequenz entspricht<sup>[82,85]</sup>:

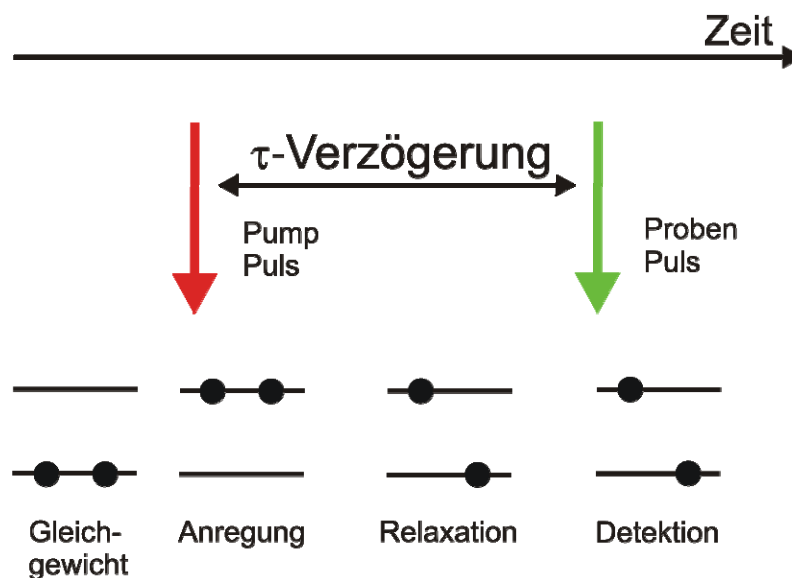
$$\nu_{Idler} = \nu_{Pump} - \nu_{Signal} \quad (17)$$

Diese neue Frequenz erzeugt mit dem 400 nm Puls wiederum Licht mit der Frequenz von  $\nu_{Signal} = \nu_{Pump} - \nu_{Idler}$ , wodurch der ursprünglich schwache Signal-Anteil des Weißlichtes verstärkt wird. Dieser Prozess setzt sich nun fort, so dass die Signal und Idler Pulse verstärkt und der Pump Puls abgeschwächt wird. Über die zweite Mikrometer-Stage können im zweiten Durchgang der Pump Puls und der bereits verstärkte Signal und Idler Puls erneut überlagert werden, so dass im Idealfall ein Sättigungszustand zwischen den drei Frequenzen erreicht wird.

Somit werden durch den OPA Pulse mit den Frequenzen  $\nu_{\text{Signal}}$  und  $\nu_{\text{Idler}}$  erhalten sowie die übrigen 400 nm Pumpstrahl Reste, welche abgeblockt werden, da sie nicht für die Experimente benötigt werden. Die erreichbaren Wellenlängen für die Signal Pulse liegen zwischen 500 und 700 nm, so dass sich für die Idler Pulse Wellenlängen im Bereich von 0,9 bis 2,4  $\mu\text{m}$  ergeben. Zudem werden durch einen eins zu fünf Strahlteiler 20% des Weißlichtes aus dem OPA ausgekoppelt.

## 6.2 Pump-Probe-Aufbau

Eine weit verbreitete Meßmethode der Kurzzeitspektroskopie ist das Anrege- (Pump) Abfrage- (Probe) Experiment<sup>[86]</sup>. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, mit Hilfe eines Anregepulses (Pump-Puls) Veränderungen/Absorptionen in der Probe hervorzurufen, die dann nach genauer zeitlicher Verzögerung mit Hilfe des Abfragepulses (Probe-Puls) erfasst werden. Hierzu müssen Pump- sowie Probenpuls genau räumlich überlappen, damit sie dasselbe Probenvolumen anregen bzw. abfragen. Abbildung 6-5 verdeutlicht dieses Messprinzip.



**Abbildung 6-5: Prinzip der Anrege-Abfrage Meßmethode. Ein Pump-Puls hoher Intensität führt zu Veränderungen in der Probe, die durch den mit variabler zeitlicher Verzögerung kommenden Proben-Puls abgefragt werden.**

Der genaue räumliche Überlapp von Pump- und Proben-Puls wird hierbei durch Justage der beiden Pulse durch ein 30  $\mu\text{m}$  Pinhole gewährleistet. Dieses wird exakt an derselben Stelle befestigt, an der später im Experiment die Küvette befestigt ist.

Der nun erfolgte räumliche Überlapp der beiden Pulse macht es möglich, den zeitlichen Überlapp mit Hilfe eines nichtlinearen BBO-Kristalls ( $\beta$ -Barium-Borat) einzustellen. Durch Selektion der starken 800 nm Fundamentalwelle aus Pump- und Probenstrahl lassen sich hinter dem Kristall zwei frequenzverdoppelte Spots erzeugen. Durch langsames Verfahren der Linearstage stimmt man die beiden Weglängen im optischen Aufbau von Pump- sowie vom Proben-Puls exakt aufeinander ab (1 mm Wegstrecke entspricht 3,3 ps) und es kommt bei korrekter Phasenanpassung des Kristallwinkels zu dem Prozess der nichtkollinearen Summenfrequenzerzeugung und somit zu einem dritten Spot hinter dem Kristall. Diese Position der Linearstage entspricht dem Nullpunkt für folgende Experimente. Die Intensität des Proben-Pulses wird nun nach Durchqueren der zu untersuchenden Substanz mit und ohne Anregung durch den Pump-Puls gemessen und miteinander verglichen ( $I(\omega_{\text{Probe}}, t)$  und  $I_0(\omega_{\text{Probe}})$ ). Je nach Frequenz des Proben-Pulses kann nun durch transiente Absorption in höher angeregte Zustände seine Intensität abnehmen oder, infolge von Ausbleichen des Grundzustandes oder stimulierter Emission, verstärkt werden. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz gilt:

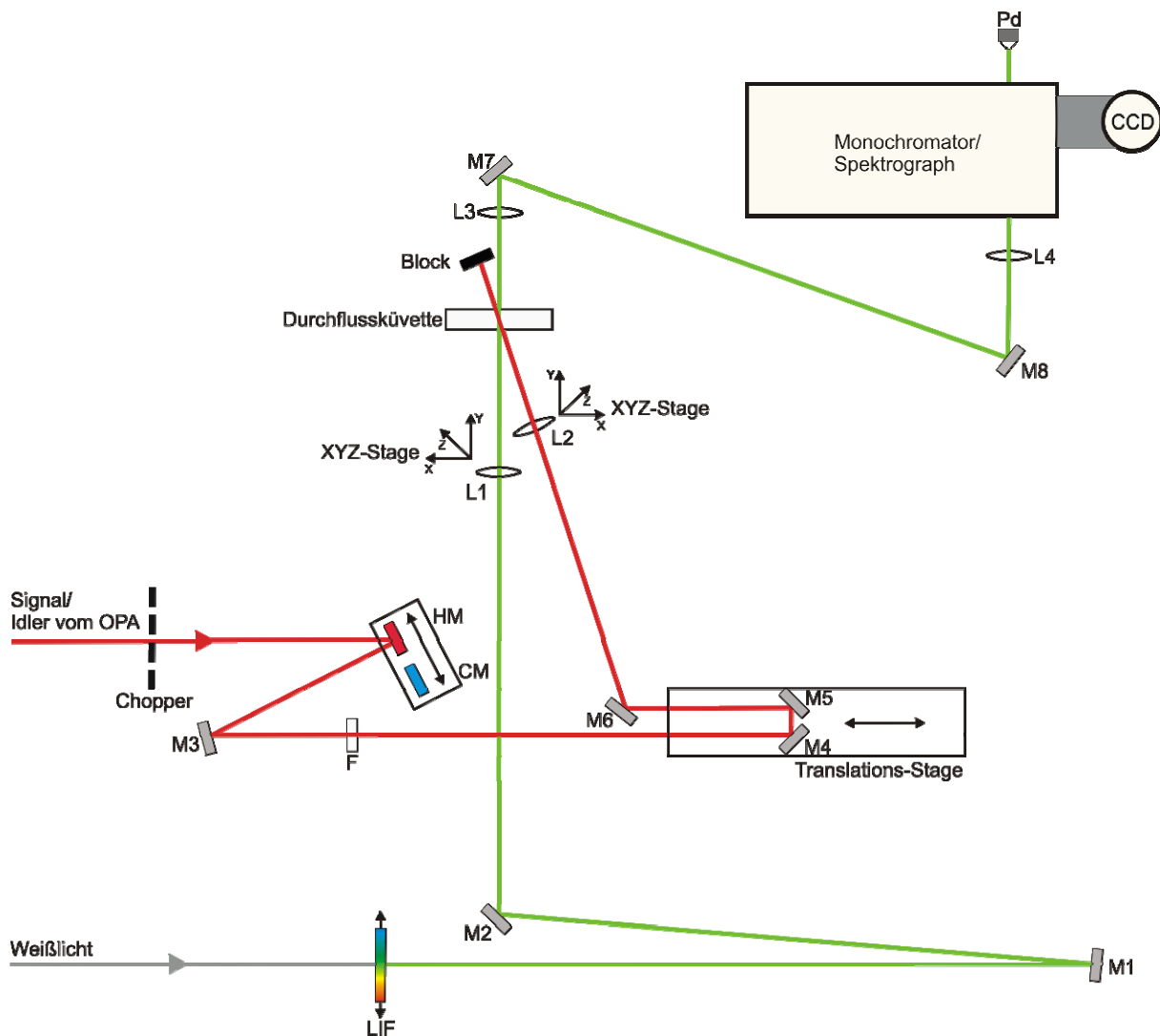
$$I(\omega_{\text{Probe}}, t) = I_0(\omega_{\text{Probe}}) \cdot 10^{-\varepsilon_{\omega} N(t) L} \quad (18)$$

Hierbei ist  $\varepsilon_{\omega}$  der Absorptionskoeffizient der zu untersuchenden Substanz bei der Probenfrequenz  $\omega$ ,  $N(t)$  die Population des Ausgangszustandes und  $L$  die optische Weglänge innerhalb der Durchflussküvette. Die nun interessierende optische Dichte ist definiert als<sup>[87]</sup>:

$$OD(\omega_{\text{Probe}}, t) = -\log \frac{I(\omega_{\text{Probe}}, t)}{I_0(\omega_{\text{Probe}})} = \varepsilon_{\omega} N(t) L \quad (19)$$

Hierdurch ist man in der Lage, bei einer festen Beobachtungsfrequenz  $\omega$  die Änderung der optischen Dichte in Abhängigkeit der Verzögerungszeit  $t$  zu messen und so einen direkten Einblick in die Populationsdynamik der durch den Pump-Puls angeregten Zustände zu erhalten.

Abbildung 6-6 zeigt den verwendeten Aufbau des Experimentes.



**Abbildung 6-6: Schematischer Pump-Probe-Aufbau.** Pump- und Probenpuls müssen exakt dieselbe Wegstrecke zurücklegen, bevor sie in die Durchflussküvette fokussiert werden. Eine computergesteuerte variable Translationsstage dient als definierte Verzögerungsstrecke.

Die Separation von Signal und Idler des OPAs erfolgt mit Hilfe eines Hot-Mirrors (HM, Reflektion  $\sim 90\%$ ,  $\lambda = 850\text{-}1600\text{ nm}$ ) bzw. Cold-Mirrors (CM, Reflektion  $\sim 90\%$ ,  $\lambda = 420\text{-}650\text{ nm}$ ), die auf einer Translationsstage befestigt sind und somit ein Umschalten beider Frequenzbereiche ohne Weglängenunterschied möglich machen. Reste von unerwünschten spektralen Bereichen werden mit nachgeschalteten Cut-Off Filtern (F, Long Pass Filter, 900 nm Cut Off, Short Pass Filter, 750 nm Cut Off) beseitigt. Nachdem der Pump-Puls eine variable, computergesteuerte Verzögerungsstrecke zurücklegt (Newport, M-ILS200CCHA, Verstellweg: 200 mm, Positionsauflösung: 0,1  $\mu\text{m}$ ), wird er mit Hilfe einer achromatischen

Linse (L2,  $f_l = 50$  mm) in die Probenküvette fokussiert. Ein linearer Interferenzfilter (LIF, Filter Veril INT 400-1000 nm, spektrale Halbwertsbreite  $\sim 30$  nm von  $\lambda = 500$ -600 nm) dient dazu, die Wellenlänge des Probenpulses auf das jeweilige Experiment voreinzustellen. Der Puls wird, nachdem er exakt dieselbe Weglänge zurückgelegt hat wie der Pump-Puls, mittels einer achromatischen Linse (L1,  $f_l = 100$  mm) in die Probenküvette fokussiert und dort räumlich exakt mit dem Fokus des Pump-Pulses überlagert. Hierzu sind beide Linsen (L1, L2) auf XYZ-Translationsstages montiert, womit optimale Justagemöglichkeiten gegeben sind. Es wurde darauf geachtet, beide Pulse unter möglichst kleinem Winkel ( $\sim 25^\circ$ ) in die Küvette zu fokussieren, um das fokale Überlappungsvolumen zu maximieren.

Im weiteren Strahlengang nach der Durchflussküvette wird der Pump-Puls geblockt und der transmittierte Proben-Puls kollimiert (L3,  $f_l = 200$  mm) und in den Monochromator/Spektrograph eingekoppelt (L4,  $f_l = 100$  mm). Alle weiteren Spiegel des optischen Aufbaus (M1-M8) sind hochreflektive Silberspiegel (New Focus, Reflektion  $>99\%$ ,  $\lambda = 0,45$ -12  $\mu\text{m}$ ).

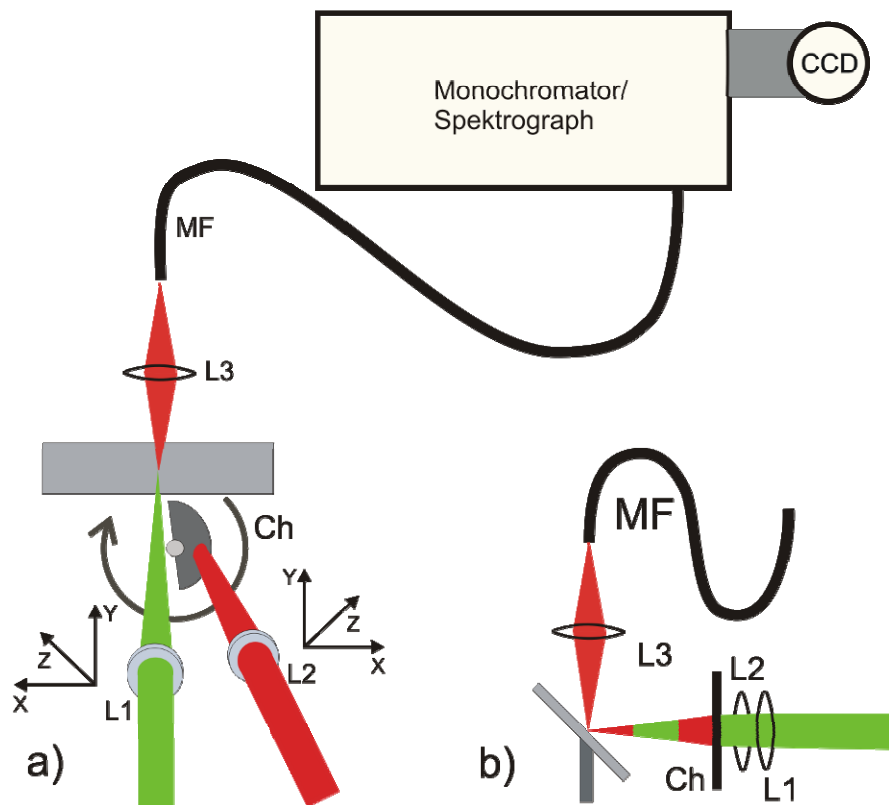
### **6.3 Durchflussküvette**

Alle Pump-Probe Messungen wurden mit Hilfe einer Quarzglas Durchflussküvette mit einer optischen Weglänge von zwei Millimetern durchgeführt. Für die Messungen standen mehrere Peristaltikpumpen zur Verfügung, um die verwendeten Proben entweder in einem geschlossenen Kreislauf durch die Küvette zu pumpen oder bei kleineren Volumina periodisch vor- und zurück zu pumpen. Das benötigte Probenvolumen konnte hierdurch auf 500  $\mu\text{L}$  reduziert werden.

### **6.4 Aufbau der Fluoreszenzmessungen**

Um mit dem vorhandenen Pump-Probe-Aufbau zeitabhängige Fluoreszenzmessungen an lebenden Pflanzen durchführen zu können, wurde er wie Abbildung 6-7 zeigt geringfügig abgeändert.





**Abbildung 6-7 a):** Perspektivische Draufsicht des verwendeten Aufbaues zur Messung von Chlorophyll a Fluoreszenz in intakten Blättern. Der optische Chopper (Ch) aus dem Pumpstrahl wurde entfernt und stattdessen dazu benutzt, abwechselnd zwei verschiedenen Wellenlängen in die Probe zu fokussieren. **b):** Die Seitenansicht zeigt den Winkel der Probenstage von 45°. Die Fluoreszenz wurde im Winkel von 90° zu den Anregungsstrahlen gemessen und mittels einer achromatischen Linse (L3, fl = 50 mm) in eine Multimodenfaser (MF) eingekoppelt.

Die für die Messungen benötigten Wellenlängen liefert der OPA in Form des Idlers (IR = rot) und des Weißlichtes (VIS = grün). Die Wellenlängenseparation des sichtbaren Anteiles erfolgt mit Hilfe des linearen Interferenzfilters (siehe Abbildung 6-6). Beide Wellenlängen werden in der Probe mittels achromatischer Linsen räumlich überlagert (L1, fl = 100 mm; L2, fl = 50 mm). Ein modifizierter optischer Chopper (Ch) mit einer variablen Drehzahl von 4-8 U/min blockt abwechselnd jeweils einen der Anregungsstrahlen. Die Fluoreszenz wird im 90° Winkel zur Anregung mit einer achromatischen Linse (L3, fl = 50 mm) in eine Multimoden-Faser (MF, Ocean Optics VIS/NIR, 500 µm) eingekoppelt, die direkt mit dem Spektrographen verbunden ist. Die Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe der CCD-Kamera, die intern getriggert wurde, um zeitabhängig messen zu können.

## 6.5 Monochromator/Spektrograph und Detektoren

Der für alle Untersuchungen verwendete Monochromator/Spektrograph mit der Bezeichnung 500 IS/SM der Firma Chromex besitzt drei verschiedene Gitter mit 100, 600 und 1200 Linien/mm mit Blaze-Winkeln der Wellenlängen 450, 1000 und 400 nm. Das Umschalten zwischen Monochromator- und Spektrographen-Modus ermöglicht entweder die selektive Aufnahme einer speziellen Wellenlänge oder die eines gitterabhängigen spektralen Bereiches. Hierfür stehen jeweils ein Detektor, eine schnelle Photodiode zur intensitätsabhängigen Aufnahme einzelner Wellenlängen sowie eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte sensitive CCD-Kamera zur Aufnahme ganzer spektraler Bereiche zur Verfügung. Weiterhin stand für die Justage des OPAs und zu schnellen Prüfmessungen ein USB-Spektrometer (USB2000, 350-1000 nm, Grating 3-600 Linien/mm, Blaze-Winkel 500 nm) mit angekoppelter Multimoden-Faser (VIS/NIR, 600  $\mu$ m) der Firma Ocean-Optics zur Verfügung.

## 6.6 Digitale Datenaufnahme

Als Detektoren dienen entweder eine selbst gebaute schnelle Photodiode zur intensitätsabhängigen Aufnahme einzelner Frequenzen (Design Prof. D. Schwarzer) oder eine hochempfindliche CCD-Kamera (SDS 9000/EEV15-11B, Photometrics, Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Deutschland) für die Aufnahme ganzer spektraler Bereiche. Die Kamera lässt sich intern triggern, so dass Bilder in kurzen Zeitabständen (Zeitabstand ist abhängig von dem ausgelesenen CCD-Chip Segment und der Datenauflösung) als zeitabhängige Daten zur Verfügung stehen.

Die bei Pump-Probe Messungen anfallenden Signale der schnellen Photodiode sind wegen des zu schlechten Signal- zu Rauschverhältnis qualitativ zu schlecht, um sie direkt aufzeichnen zu können. Sie werden deshalb mit einem Lock-In Verstärker (EG & G 5205, Dumberry, Canada) verstärkt.

Bei der Lock-In Verstärkertechnik wird das eigentliche Signal mit Hilfe eines externen Signals (optischer Chopper, SR540, Stanford research systems) moduliert. Mit Hilfe dieser Modulation wird im Lock-In Verstärker ein Schaltsignal erzeugt, das phasenstarr an die Modulation angekoppelt werden muss und die Form eines bipolaren Rechtecksignals hat. Der Verstärker multipliziert nun permanent das gemessene Signal mit dem Schaltsignal und filtert

so die Amplitude des Signals aus dem Rauschen heraus. Die gemessenen Amplituden werden analog gemittelt, die Mittelungszeit wird am Gerät üblicherweise schlicht als Zeitkonstante bezeichnet. Das verstärkte Signal wird über eine Analog/Digital-Wandlerkarte (DT 304, Data Translation) in den Messrechner eingespeist.

Mit Hilfe einer in Labview<sup>TM</sup> erstellten Software (siehe Anhang) wird das Experiment gesteuert. Sie liest und steuert die Position der Linearstage bei frei wählbarem Nullpunkt. Die einstellbaren zeitlichen Intervalle mit wählbarer zeitlicher Schrittweite werden in Schleifen (Loops) abgefahren und die Messwerte als 2D-Plot der Verzögerungszeit von Pump- und Probenpuls gegen die Intensität der Photodiode (Änderung der optischen Dichte  $OD(\omega_{\text{Probe}}, t)$ ) ausgegeben. Die einstellbare Anzahl der Wiederholungen und die aufgenommenen zeitlichen Verläufe werden als Mittelwert dargestellt und als ASCII-Dateien gespeichert.

Aufgenommene Spektren der CCD-Kamera wurden mit Hilfe der Software MAPS-Measurement aufgezeichnet und in ASCII-Files konvertiert.

## 6.7 Pulscharakteristik

Im Allgemeinen wird zur Messung eines Signals eine Schalterfunktion benötigt, die wesentlich kürzer ist als das Signal selbst. Dies ist bei Laserpulsen, die eine Halbwertsbreite im Femtosekundenbereich besitzen nicht möglich, da eine elektronische Antwortfunktion auf einen zu messenden Puls zeitlich breiter wäre ( $\sim 1$  ps) als der Puls selbst. In diesem Fall benutzt man den zu vermessenden Puls selbst als Zeitfenster, man benutzt optische Korrelationsmessungen zur Bestimmung der Pulsdauer<sup>[88]</sup>.

Jeder Laserpuls ist vollständig durch sein raum- und zeitabhängiges elektrisches Feld  $\vec{E}(\vec{r}, t)$  beschrieben. Im Folgenden wird von einem linear polarisierten Feld ausgegangen und nur die Zeitabhängigkeit betrachtet. Um die analytische Beschreibung zu vereinfachen, wird normalerweise die komplexe Darstellung gewählt, wobei das elektrische Feld der Realteil der komplexen Funktion  $\tilde{E}(t)$  ist.

$$\tilde{E}(t) = A(t) \exp(i\omega_0 t + i\varphi(t)) \quad (20)$$

Hierbei ist  $A(t)$  die Einhüllende des Laserpulses,  $\omega_0$  die Trägerfrequenz und  $\varphi(t)$  die zeitabhängige Phase. Die Beschreibung mit einer Trägerfrequenz  $\omega_0$  ist sinnvoll für nicht zu kurze Pulse, bei denen die spektrale Bandbreite deutlich kleiner ist, als die Trägerfrequenz.

Unter der Annahme einer Gaussfunktion als Einhüllende des elektrischen Feldes eines Femtosekundenpulses gilt:

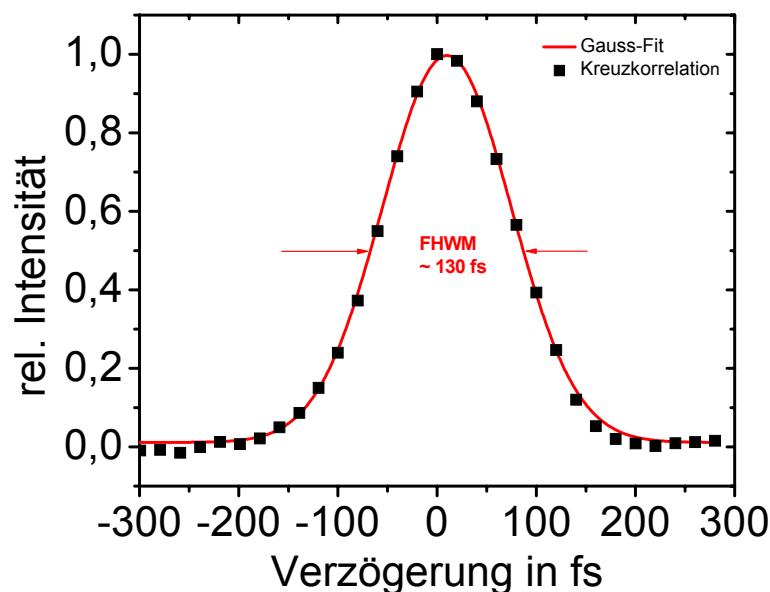
$$A(t) = A_0 \exp(-(t/\tau_{G0})^2), \quad (21)$$

wobei  $A_0$  die maximale Amplitude ist und  $\tau_{G0} = \tau_p / \sqrt{2 \ln 2}$  mit  $\tau_p$  der Pulsdauer (FWHM – full width at half maximum) darstellt. Zusammen mit der spektralen Bandbreite  $\Delta\nu_p$  ergibt sich das Zeit-Bandbreite-Produkt eines Gauss-förmigen Pulses.

$$\tau_p \cdot \Delta\nu_p \geq 0,441 \quad (22)$$

Das Gleichheitszeichen gilt im Falle eines bandbreitebegrenzten Pulses.

Die experimentelle Pulsweitenbestimmung wurde mit einem nichtlinearen BBO ( $\beta$ -Barium-Borat)-Kristall durchgeführt, der anstelle der Durchflussküvette in den fokalen Überlappungsbereich eingesetzt wurde. Da der verwendete Pump-Probe-Aufbau grundlegend einen Autokorrelator/Kreuzkorrelator darstellt, der geeignet ist, Aussagen über die Halbwertsbreite der verwendeten Pulse zu treffen, konnten die Kreuz-/Auto-korrelationsmessung direkt vor den jeweiligen Experimenten durchgeführt werden.



**Abbildung 6-8: Autokorrelation der 800 nm Fundamentalreste von Pump- und Probenstrahl.**

Hierzu wurden die 800 nm Fundamentalwellen des Pump- und Probenstrahls nichtkollinear in den BBO-Kristall fokussiert, und die Intensität der Summenfrequenz in Abhängigkeit der zeitlichen Verzögerung zwischen den beiden Pulsen aufgezeichnet, wobei für das Korrelationssignal  $A(\tau)$  gilt:

$$A(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} I_{2\omega}(t) I_{\omega}(t - \tau) dt \quad (23)$$

$I_{2\omega}(t)$  bezeichnet hierbei die Intensität der zweiten Harmonischen und  $I_{\omega}(t)$  die des Fundamentalpulses. Der Verlauf der Korrelation ist in Abbildung 6-8 dargestellt und stellt letztendlich das Ergebnis einer Faltung des Pulses mit sich selbst dar. Die Pulsdauer  $\tau_p$  (FWHM der Intensität) lässt sich aus der gemessenen Autokorrelationsbreite  $\tau_{AC}$  (FWHM der Intensität) berechnen, wobei auch hier von einer Gaussfunktion als Einhüllende des zeitlichen Intensitätsprofils ausgegangen wird.

$$\tau_p = \frac{\tau_{AC}}{\sqrt{2}} \quad (24)$$

Für die gemessene Autokorrelation aus Abbildung 6-8 ergibt sich somit eine Pulsdauer  $\tau_p$  von gut 90 fs.

## 7 Zweiphotonen Pump-Probe Untersuchungen am PS I

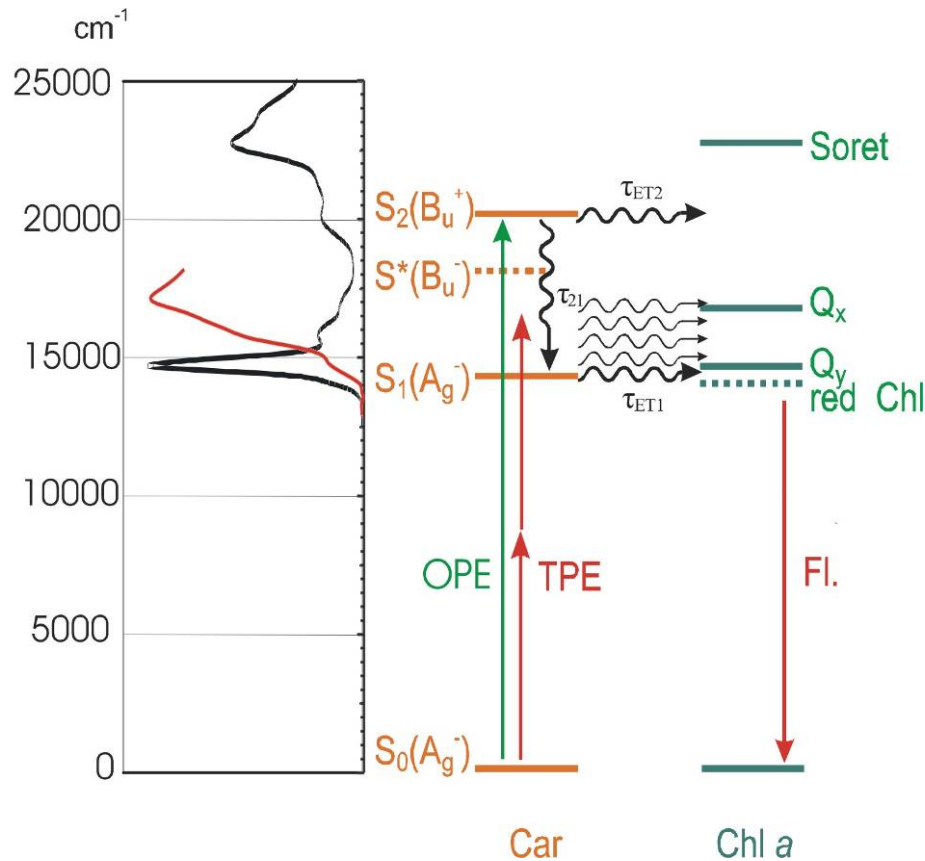
### 7.1 Einführung

Aufgrund des einphotonen-verbotenen  $S_1$ -Zustandes von  $\beta$ -Carotin ist die Energie dieses Zustandes und der Energieübertragungsweg auf die Chlorophylle des Photosystem I in der Literatur sehr widersprüchlich. Abbildung 7-1 zeigt das Energiediagramm von PS I und verdeutlicht den Unterschied zwischen Ein- und Zweiphotonenanregung der Carotinoide. Links davon aufgetragen sind das Absorptionsspektrum des PS I, sowie das Zweiphotonen-Anregungsspektrum des Proteinkomplexes.

Im gezeigten Energieniveaudiagramm ist ein weiterer Energiezustand zwischen dem  $S_1$ - und dem  $S_2$ -Zustand des Carotins eingezeichnet, der  $S^*$ -Zustand mit  $B_u^-$ -Symmetrie. Dieser Übergangszustand wurde erstmal von Tavan<sup>[43]</sup> et al. postuliert und entsteht aus Kombination der Triplett-Zustände  $1^3B_u$  und  $1^3A_g$ . Aufgrund der Tatsache, dass der  $S_0 \rightsquigarrow S^*$  Energietransfer sowohl ein- als auch zweiphotonen verboten ist, ist die experimentelle Detektion dieses Zustandes auch aufgrund seiner schnellen Relaxation in den  $S_1$ -Zustand sehr schwer. Der trimere Komplex des PS I bietet sich für diese Untersuchungen aus dem Grund an, da er nur die Pigmente  $\beta$ -Carotin und Chlorophyll a enthält, so dass die Zuordnung der gefundenen Energien und Energiewege auf nur zwei Pigmente beschränkt sind.

Kennis et al. ordneten in einer Fluoreszenz-Aufkonversions-Untersuchung<sup>[89]</sup> des Photosystems I aus *Thermosynechococcus elongatus* eine schnelle Anstiegskomponente (1,2 ps) der Chlorophyll Fluoreszenz dem Car  $S_1 \rightsquigarrow$  Chl Energietransfer zu. Die Abschätzung der Energie-Übertragungseffizienz von den Carotinoiden auf die Chlorophylle ergab einen Wert von ~90%. Untersuchungen des vergleichbaren Trimers aus *Synechocystis* PCC6803 ergaben einen vergleichbaren Wert von ~85% bei 77 K<sup>[90]</sup>. In einer späteren Studie von de Weerd<sup>[91]</sup> et al. wurden mittels Pump-Probe Experimenten ein kleinerer Beitrag von 3 ps für den Energietransfer von Car  $S_1 \rightarrow$  Chl bestimmt mit einer Gesamt-Übertragungseffizienz von nur noch 70%. Die vor kurzem von Holt<sup>[92]</sup> et al. wiederholten Fluoreszenz-Aufkonversions Experimente an PS I, CP43, CP47 und Reaktionszentrum (RZ) von PS II zeigten eine viel kürzere Lebensdauer für den  $S_2$ -Zustand und die Autoren konnten keinen Beitrag des  $S_1$  Carotin-Zustandes zum Energietransfer auf die Chlorophylle feststellen. Sie bestimmten die Gesamt-Übertragungseffizienz bei 77 K zu 62% und betonten, dass es

keine oder nur eine sehr geringe Energieübertragung von im vibronischen Grundzustand vorliegenden  $S_1$ -Carotinoiden auf die Chlorophylle gibt. Laut Meinung der Autoren könnte die Energieübertragung nur aus vibronisch angeregten Banden (hot bands) erfolgen.



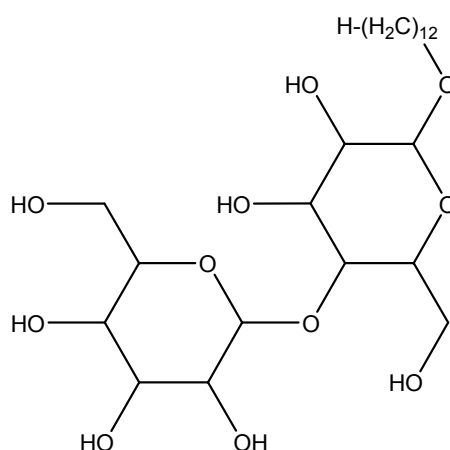
**Abbildung 7-1** Links: Absorptionsspektrum (schwarz) und zweiphotonen Anregungsspektrum (rot) von PS I. Rechts: Energieniveaudiagramm des PS I. Car:  $\beta$ -Carotin; Chl a: Chlorophyll a; TPE: Zweiphotonenanregung; OPE: Einphotonenanregung; Fl.: Chlorophyll a Fluoreszenz;  $\tau_{ET2}$  und  $\tau_{ET1}$ : Zeitkonstanten für den Car  $S_2 \rightsquigarrow$  Chl und Car  $S_1 \rightsquigarrow$  Chl Energietransfer;  $\tau_{21}$ : Zeitkonstante für die interne Konversion (IC) Car  $S_2 \rightsquigarrow$  Car  $S_1$ .

## 7.2 Probenvorbereitung

Die in dieser Arbeit verwendeten PS I Proteinkomplexe wurden aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* (früher klassifiziert als *Synechococcus elongatus*) gewonnen. Aufzucht, Gewinnung und Reinigung der verwendeten Proben erfolgte am Max-Volmer-Institut für Biophysikalische und Physikalische Chemie der TU Berlin unter der Verantwortlichkeit von Dr. Petra Fromme. Ihr sei in Verbindung mit Dr. Eberhard Schlodder an dieser Stelle herzlich gedankt.

Die genaue Vorgehensweise der Gewinnung des trimeren PS I aus dem Cyanobakterium kann unter (Fromme & Witt<sup>[93]</sup> 1998) nachgelesen werden. Im Folgenden sollen nur einige Worte zur prinzipiellen Vorgehensweise gesagt werden.

Die Zellen wachsen in einer Nährlösung in künstlich beleuchteten und mit CO<sub>2</sub> begasten Bioreaktoren bei einer Temperatur von ca. 55°C heran. Innerhalb von vier Tagen verfünffacht sich die Biomasse und die Zellen werden durch Zentrifugieren von der Nährlösung getrennt, mit Pufferlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch Zusatz von Lysozym werden die Zellwände angedaut und die Zellen durch das Pressen durch eine enge Kanüle aufgebrochen. Erneutes Waschen und Zentrifugieren isoliert die Thylakoid-Fraktion, d.h. das Membransystem, das den gewünschten trimeren photosynthetischen Proteinkomplex PS I enthält. Das in-Lösung-bringen der membranständigen Proteinkomplexe aus der Thylakoidmembran erfolgt durch Inkubation mit Detergentien. Für die Unversehrtheit des PS I Kernantenne-RZ-Komplexes hat es sich als entscheidend erwiesen, hierbei ausschließlich Dodecyl-β-D-maltosid (Abbildung 7.2) zu verwenden.



**Abbildung 7-2: Struktur des Dodecyl-β-D-maltosid (β-DM) als Detergenz für den PSI-Komplex.**

Es ermöglicht die Aufrechterhaltung seiner Struktur und Funktionsfähigkeit durch Mizellbildung, als schützende Ummantelung des Komplexes. Die Abtrennung aller übrigen Protein-Bestandteile erfolgt zunächst wieder durch Waschen und Zentrifugieren. Dabei werden die übrigen Fraktionen nach ihrem Molekulargewicht geschichtet und können grob abgetrennt werden. Die endgültige Reinigung erfolgt anschließend chromatographisch über verschieden gepackte Säulen in mehreren Zyklen. Der am Ende dieser Prozedur vorliegende PS I Kernantenne-RZ-Komplex ist so rein, dass er unter entsprechenden Bedingungen kristallisiert. Die Massenausbeute (PS I/Zellmasse) liegt etwa bei einem Promille und die Lösungen können durch Ultrafiltrationen konzentriert werden.



Die verwendete trimere PS I Probe hatte eine Ausgangskonzentration von  $\sim 8$  mM Chlorophyll a. Die Messungen erfolgten in einem wässrigen Puffer aus:

- 20 mM (N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)
- 20 mM KCl
- 20 mM  $\text{CaCl}_2$
- 0,02% Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ( $\beta$ -DM)

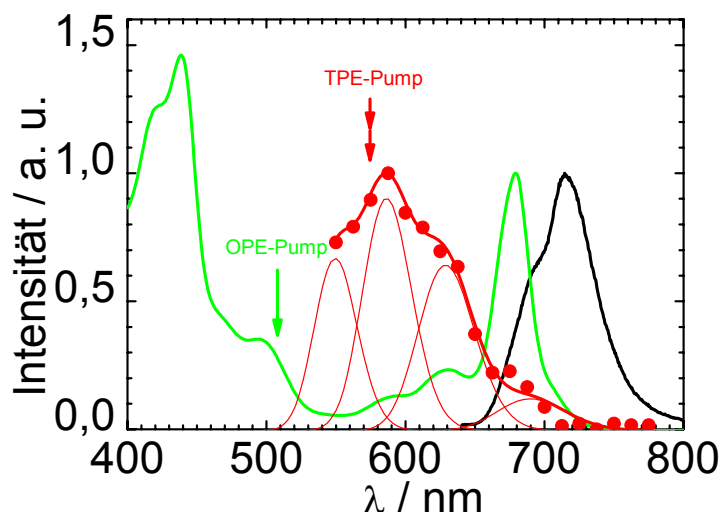
Dabei wurden die Probe mit Puffer im Verhältnis 1:20 auf eine Chlorophyllkonzentration von ca. 0,4 mM ( $\sim 26$   $\mu\text{M}$  Photosystem I) verdünnt, was einer optischen Dichte von  $\text{OD} \sim 0,6$  ( $\lambda = 550$  nm, optische Weglänge  $l = 2$  mm) entspricht. Nach dem Lösen der Probe in einem Ultraschallbad wurde vor jeder neuen Messung vier Minuten mit 8000 g zentrifugiert.

Als Referenz bei allen Messreihen wurde eine gesättigte Lösung von  $\beta$ -Carotin in Oktan gewählt, welche vor jeder Messung frisch angesetzt und vor der Messung ebenfalls vier Minuten mit 8000 g zentrifugiert wurde.

### 7.3 $\beta$ -Carotin-Dynamik nach Ein- und Zweiphotonenanregung im PS I

Für die Pump-Probe Zweiphotonenuntersuchungen des Photosystems I wurde eine Wellenlänge von 1150 nm als Pumpwellenlänge gewählt. Da aus früheren Arbeiten das Zweiphotonen-Anregungsspektrum bekannt war<sup>[11]</sup>, konnte es für die Auswahl der Pumpwellenlänge herangezogen werden (Abbildung 7-3).

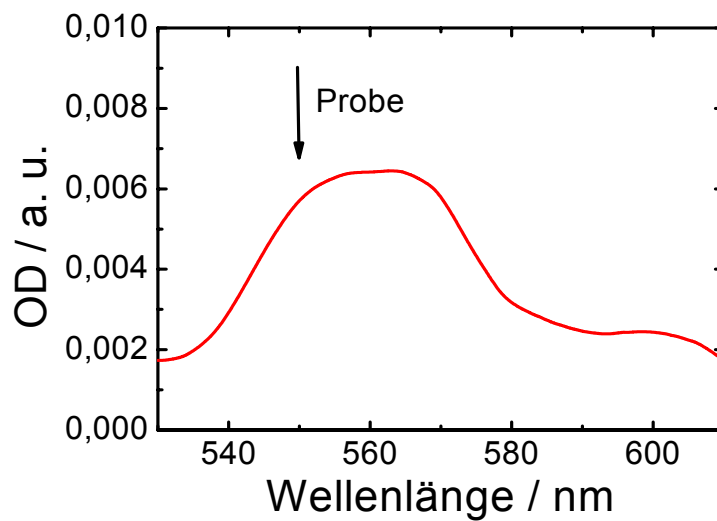
Zu beachten ist, dass diese Anregungsenergie bereits oberhalb der Energie des  $S_1$ -Zustandes von  $\beta$ -Carotin liegt und es auch zu einer geringfügigen Anregung höherer vibronischer Banden kommt.



**Abbildung 7-3:** Zweiphotonen-Anregungsspektrum des PS I (rot), in Kombination mit dem Einphotonen-Absorptionsspektrum (grün) und dem Fluoreszenzspektrum (schwarz) nach Anregung bei 500 nm. Die farbigen Pfeile markieren die Pump-Wellenlängen für die Ein- und Zweiphotonenanregung. Um die real angeregten Energiezustände darzustellen, wurden die Intensitäten der Zweiphotonenanregung gegen die halbe Anregungswellenlänge aufgetragen ( $\lambda_{\text{Exc}}/2$ ).

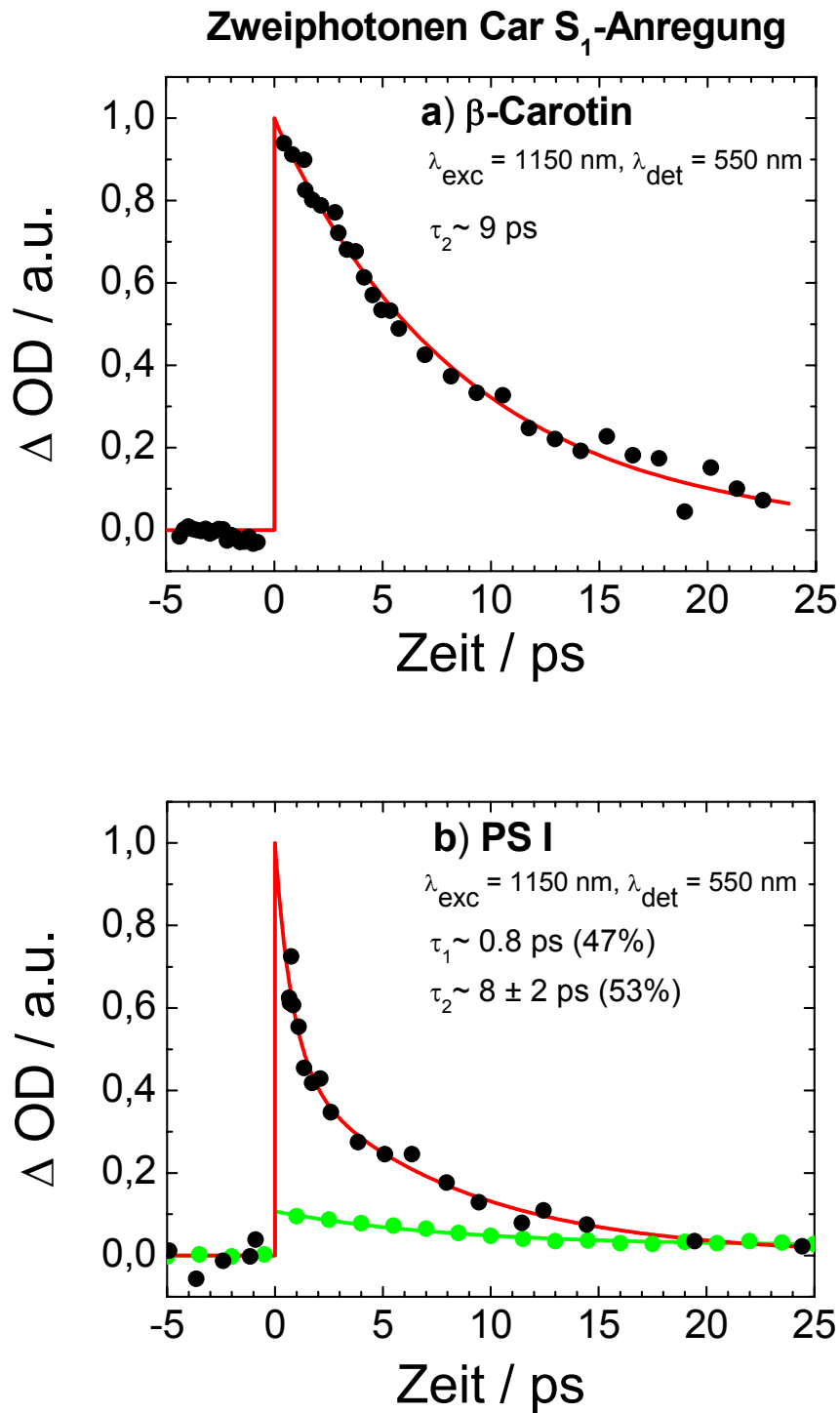
Die einphotonen Pump-Probe Experimente wurden mit 508 nm als Pumpwellenlänge durchgeführt, dem Maximum der  $S_2$ -Absorption des  $\beta$ -Carotins.

Als Proben-Wellenlänge wurde in allen Messungen 550 nm ausgewählt, das Maximum der starken transienten Absorption  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  des  $\beta$ -Carotins (Abbildung 7-4). Die Datenaufnahme erfolgte hierbei mit ungefiltertem Weißlicht des OPAs unter Verwendung des Spektrographen. Bei Einsatz eines Gitters mit 100 Linien/mm und der zentralen Wellenlänge von 570 nm wurde ein spektraler Bereich von 80 nm Breite ausgekoppelt und von der sensitiven CCD-Kamera detektiert.



**Abbildung 7-4:** Transiente Absorption des Photosystems I in der spektralen Region der Car  $S_1 \rightarrow$  Car  $S_n$  Übergänge, nach Anregung in den  $S_2$ -Zustand bei 508 nm und einer zeitlichen Verzögerung zwischen Anregung und Detektion von 300 fs. Der Pfeil markiert die in allen Experimenten verwendete Proben-Wellenlänge von 550 nm.

In Abbildung 7-5 a) und b) sind die resultierenden Kinetiken einer Lösung von PS I und reinem  $\beta$ -Carotin nach Zweiphotonenanregung bei 1150 nm dargestellt. Ein monoexponentieller Fit der reinen  $\beta$ -Carotin Messdaten ergab eine Abklingzeit von  $8,8 \pm 0,3$  ps, was in sehr guter Übereinstimmung mit gefundenen Literaturdaten liegt<sup>[14,36]</sup>. Im Gegensatz hierzu zeigen die Messdaten des PS I kein monoexponentielles Verhalten, sondern ein biexponentielles. Ein dementsprechender Fit ergab eine Zeitkonstante von  $0,8 \pm 0,4$  ps mit einer Amplitude von 47% und einer Zeitkonstante von  $7,9 \pm 1,9$  ps mit einer Amplitude von 53%. Abbildung 7-6 a) und b) zeigen die Messdaten der einphotonen Pump-Probe Messungen derselben Proben nach Anregung des  $\beta$ -Carotin  $S_2$ -Zustandes. Die Fit-Parameter aller dargestellten Kurven sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.



**Abbildung 7-5:** Zweiphotonen Pump-Probe Daten (schwarze Punkte,  $\lambda_{\text{exc}} = 1150 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 550 \text{ nm}$ ) von a)  $\beta$ -Carotin in Oktan mit monoexponentiellem Fit (rote Kurve) und b) PS I in wässriger Pufferlösung mit biexponentiellem Fit (rote Kurve). Alle Datenpunkte um den Nullpunkt herum von -0,5 ps bis +0,5 ps wurden entfernt, um Beeinträchtigungen durch das starke kohärente Artefakt zu vermeiden. Grüne Punkte in b): Einphotonen Pump-Probe Daten derselben PS I Probe bei einer Pumpwellenlänge ( $\lambda_{\text{TPE}}/2$ ) von  $\lambda_{\text{exc}} = 575 \text{ nm}$  mit einem monoexponentiellen Fit (grüne Kurve). Es konnte keine schnelle Komponente detektiert werden.

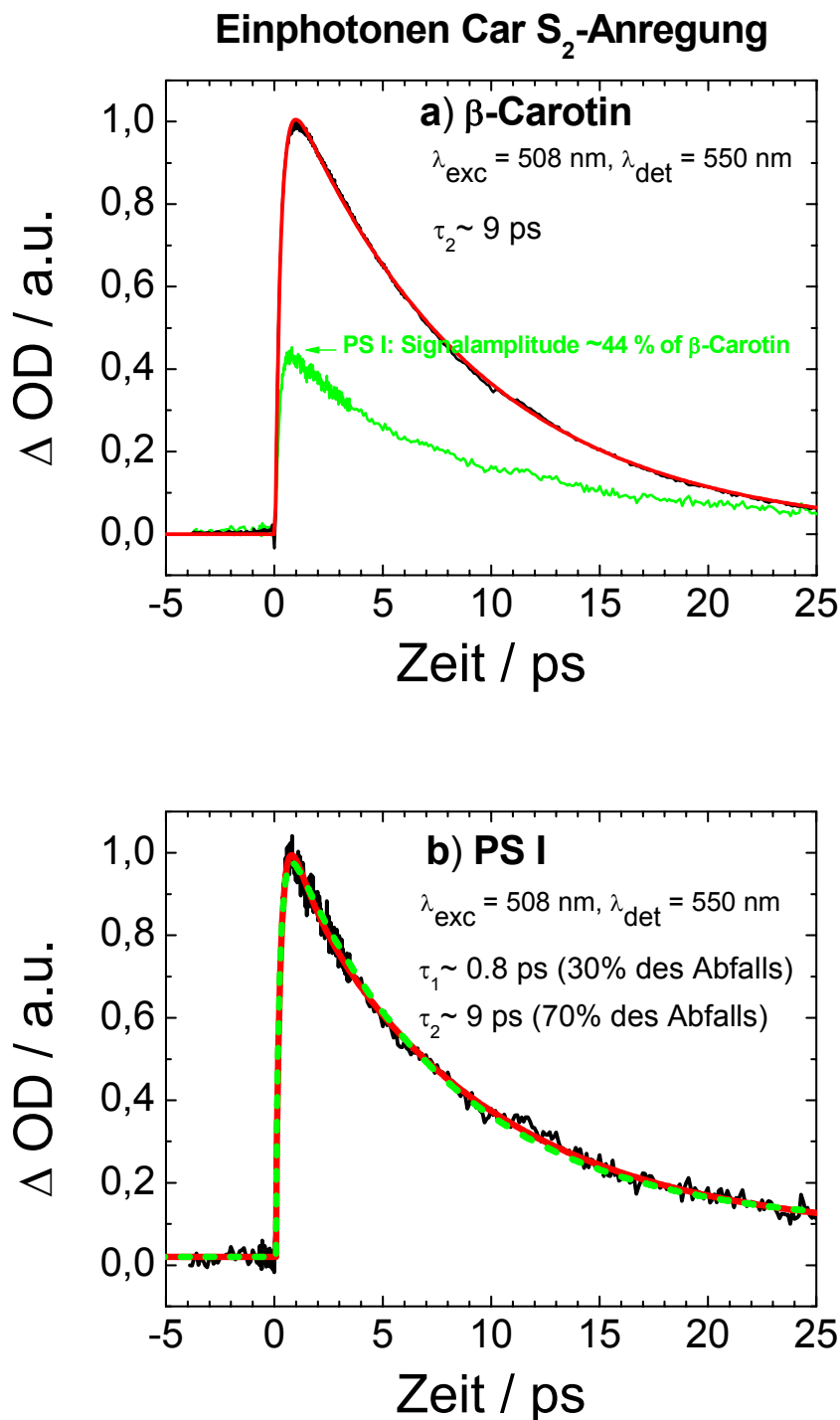


Abbildung 7-6: Einphotonen Pump-Probe Daten (schwarze Punkte,  $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 550 \text{ nm}$ ) von a)  $\beta$ -Carotin in Oktan mit biexponentiellem Fit (rote Kurve) und b) PS I in wässriger Pufferlösung mit biexponentiellem Fit und triexponentiellem Fit (rote Kurve). Grüne Kurve in a): Daten einer PS I Probe, die unter exakt denselben Bedingungen vermessen wurde, wie die  $\beta$ -Carotin Probe. Die Amplitude gibt die Bevölkerungseffizienz des S<sub>1</sub>-Zustandes im PS I an ( $\sim 44\%$ ). Grüne gepunktete Kurve in b): biexponentieller Fit anstelle des triexponentiellen, um zu verdeutlichen, dass die schnelle Komponente ( $\tau_1$ ) mit konventionellen einphotonen Pump-Probe Messungen kaum nachzuweisen ist.

| Probe         | Abb.   | $\lambda_{\text{exc}}$<br>/ nm | $\lambda_{\text{det}}$<br>/ nm | Fit Funktion   | $A_1$<br>/ %             | $\tau_1$<br>/ ps              | $A_2$<br>/ %             | $\tau_2$<br>/ ps            | $A_3$<br>/ %               | $\tau_3$ / ps                 | $y_0$<br>/ %            |
|---------------|--------|--------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| $\beta$ -Car. | 7-5 a) | 1150                           | 550                            | $\Delta OD(t) = A_2 e^{-t/\tau_2}$   | -                        | -                             | 100<br>$\pm 0$           | 8,8<br>$\pm 0,3$            | -                          | -                             | -                       |
| PS I          | 7-5 b) | 1150                           | 550                            | $\Delta OD(t) = A_2 e^{-t/\tau_1} + A_3 e^{-t/\tau_2}$                           | 47<br>$\pm 16$           | 0,79<br>$\pm 0,4$             | 53<br>$\pm 10$           | 7,9<br>$\pm 1,9$            | -                          | -                             | -                       |
| PS I          | 7-5 b) | 575                            | 550                            | $\Delta OD(t) = A_2 e^{-t/\tau_2} + y_0$   | -                        | -                             | 77<br>$\pm 3$            | 8,2<br>$\pm 0,9$            | -                          | -                             | 23<br>$\pm 2$           |
| $\beta$ -Car. | 7-6 a) | 508                            | 550                            | $\Delta OD(t) = A_1 e^{-t/\tau_2} + A_2 e^{-t/\tau_3}$                           | -                        | -                             | 100<br>$\pm 0$           | 8,6<br>$\pm 0,02$           | -112<br>$\pm 0$            | 0,27<br>$\pm 0,001$           | -                       |
| PS I          | 7-6 b) | 508                            | 550                            | $\Delta OD(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} + A_3 e^{-t/\tau_3} + y_0$ | 28<br>$\pm 5^{\text{a}}$ | 0,72<br>$\pm 0,15^{\text{a}}$ | 71<br>$\pm 6^{\text{a}}$ | 8,6<br>$\pm 0,1^{\text{a}}$ | -116<br>$\pm 6^{\text{a}}$ | 0,24<br>$\pm 0,01^{\text{a}}$ | 6<br>$\pm 0^{\text{a}}$ |
| PS I          | 7-6 b) | 508                            | 550                            | $\Delta OD(t) = A_1 e^{-t/\tau_2} + A_2 e^{-t/\tau_3} + y_0$                     | -                        | -                             | 91<br>$\pm 0$            | 7,6<br>$\pm 0,1$            | -118<br>$\pm 0$            | 0,20<br>$\pm 0,003$           | 9<br>$\pm 0$            |

**Tabelle 7-1: Zusammenfassung sämtlicher Fit-Parameter der Pump-Probe Messungen am PS I und  $\beta$ -Carotin.**

Aus den Messungen wird ersichtlich, dass die gefundene schnelle Komponente nach PS I Zweiphotonenanregung aus Abbildung 7-5 b) nicht von eventuellen Intraband Relaxationsprozessen stammen kann, da sie bei Messungen an reinem  $\beta$ -Carotin nicht nachweisbar ist (Abbildung 7-5 a)). Dies führt zu dem Schluss, dass die schnelle Komponente des biexponentiellen Abfalls zu einem Teil der  $\beta$ -Carotine gehört, die potentielle Donoren des  $\beta$ -Carotin  $S_1$ -Zustandes sind. Die gefundene Zeitkonstante von  $0,8 \pm 0,4$  ps stimmt sehr gut mit dem von Kennis et al. bestimmten Wert von 1,2 ps überein<sup>[89]</sup>. Auch die Amplitude des Fits von 47%, entsprechend der Fraktion der  $\beta$ -Carotine, die als potentielle  $S_1$  Donoren fungieren, passt zu dem aus früheren Arbeiten bekannten Wert von  $\sim 50\%$ . Dieser wurde durch Messungen des  $\beta$ -Carotin  $S_1$  0-0 Überganges von  $14.500 \text{ cm}^{-1}$  in PS I und berechneten Energiezuständen der Chlorophylle von Damjanovic et al. ermittelt<sup>[11,22]</sup>. Anzumerken ist jedoch an dieser Stelle, dass ein Pool von  $\sim 50\%$  potentiellen  $S_1$  Donoren der Carotinoide

<sup>a)</sup> Die Fehler geben nicht den wahren Messfehler an, sondern spiegeln nur die gute Übereinstimmung mit den Messdaten wieder.

nicht zwingend bedeutet, dass auch wirklich 50% der durch das  $\beta$ -Carotin absorbierten Energie über den  $S_1$ -Zustände (nach  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Car } S_1$  interner Konversion) auf die Chlorophylle übertragen wird.

Als Beweis für eine wirkliche Zweiphotonenanregung in den Experimenten und um auszuschließen, dass eventuell Chlorophyll a Zustände angeregt wurden, wurde ein einphotonen Pump-Probe Experiment mit der halben Anregungswellenlänge ( $1150 \text{ nm}/2 = 575 \text{ nm}$ ) durchgeführt. Die Probenwellenlänge blieb hierbei unverändert bei 550 nm. Das Fehlen einer schnellen Komponente in Verbindung mit der sehr schwachen Amplitude der Messung lieferte den endgültigen Beweis für die tatsächliche Zweiphotonenanregung des  $\beta$ -Carotin  $S_1$ -Zustandes (siehe Abbildung 7-5 b).

Um festzustellen, warum die schnelle Zeitkonstante nicht auch bei konventionellen einphotonen Pump-Probe Experimenten<sup>[91]</sup> nachzuweisen ist, wurden genau diese Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 508 nm und exakt identischen Bedingungen wie die Zweiphotonenanregungen durchgeführt (Abbildung 7-6 a) und b)). Als Detektionswellenlänge diente wieder 550 nm, das Maximum der starken  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  transienten Absorption. Wie frühere einphotonen Pump-Probe Messungen gezeigt haben, ist die schnelle Komponente aus den Messdaten, die neu aus den zweiphotonen Daten hervorgegangen war, nicht klar erkennbar. Der biexponentielle Fit der einphotonen Pump-Probe Daten der  $\beta$ -Carotin Lösung zeigt eine Zeitkonstante  $\tau_2$  von 8,6 ps und eine Zeitkonstante  $\tau_3$  von 270 fs. Diese Daten korrespondieren gut mit Daten aus der Literatur<sup>[14,94-96]</sup>.

Der 270 fs Anteil ist hierbei jedoch eine Überlagerung der Kinetik der internen Konversion  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Car } S_1$  und der Anregung höherer vibronischer Zustände als Folge der starken transienten Absorption  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  und somit nicht dafür geeignet, Rückschlüsse auf die zeitliche Dynamik des  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Chl}$  Energietransfers zu ermöglichen<sup>[97]</sup>.

Um die genaue Effizienz der Bildung des  $\text{Car } S_1$  Zustandes nach erfolgter  $\text{Car } S_2$  Anregung im PS I zu bestimmen, wurden beide Proben unter exakt denselben Bedingungen vermessen und die Amplituden der  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  transienten Absorption verglichen. Wichtig hierbei ist, dass beide Proben exakt gleiche optische Dichten für die jeweilige Anregungswellenlänge (508 nm) besitzen. Zusätzlich wurden die Unterschiede der Grundzustands-Absorption bei 550 nm berücksichtigt. Das Resultat zeigt eine  $\text{Car } S_1$  Bildungseffizienz im PS I von  $44\% \pm 5\%$  im Vergleich mit der reinen  $\beta$ -Carotin Probe (grüne Kurve in Abbildung 7-6 a)). Dieser Wert stimmt sehr gut mit der Abschätzung von Holt<sup>[92]</sup> et al. überein, der eine

Energieübertragungseffizienz von 57% für den Car  $S_2 \rightsquigarrow$  Chl Energietransfer bestimmt hat, sowie auch mit in anderen Veröffentlichungen publizierten Daten<sup>[89,91,94,98,99]</sup>.

Um dennoch den 800 fs Anteil des exponentiellen Abfalls aus den einphotonen Pump-Probe Daten zu erhalten, wurden als Startparameter der Fit-Funktion  $A_1$ ,  $\tau_1$ ,  $A_2$ ,  $\tau_2$  von der Zweiphotonenanregung des PS I als abfallende Bestandteile und  $A_3$ ,  $\tau_3$  aus dem Fit des  $\beta$ -Carotins nach Einphotonenanregung als schnelle Anstiegsbestandteile gewählt. Der folgende triexponentielle Fit zeigt auch nach beliebig vielen Iterationen bei nicht festgelegten Parametern einen  $\tau_1 \sim 800$  fs Anteil mit einer Amplitude von 30% (rote Kurve in Abbildung 7-6 b)). Dieses Ergebnis ist allerdings nur durch Vorgabe der Fit-Parameter zu erreichen. Gibt man sie nicht vor, kommt es zu andersartigen Datenanpassungen des Fit-Algorithmus. Um dies zu verdeutlichen, wurden die Messdaten ebenfalls biexponentiell gefittet. Auch dieses Resultat (grüne gepunktete Kurve in Abbildung 7-6 b)) spiegelt eine gute Anpassung der Daten mit einer Krümmung der Kurve wider, die vergleichbar mit dem triexponentiellen Fit ist. Der biexponentielle Fit liefert einen zeitlichen Abfall mit einer Lebensdauer von 7,6 ps.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass nur die direkte Car  $S_1$  Zweiphotonenanregung verlässliche Ergebnisse der schnellen Car  $S_1$  Kinetiken liefert und erklärt gleichermaßen die breit gestreuten Literaturdaten, die mittels Fluoreszenz-Aufkonversionsmessungen oder einphotonen Pump-Probe Messungen entstanden sind. Vergleichbare Messungen wurden auch schon für einen anderen photosynthetischen Komplex, den Lichtsammelkomplex II (LHC II) durchgeführt<sup>[9,10]</sup>.

## 7.4 Diskussion der Ergebnisse

Aus den Messdaten der zweiphotonen Pump-Probe Experimente geht hervor, dass ein signifikanter Anteil der  $\beta$ -Carotine Energie aus dem Car  $S_1$  Zustand auf benachbarte Chlorophylle übertragen kann. Die gemessene Amplitude der Bevölkerung des Car  $S_1$  Zustandes von  $47 \pm 16\%$  stimmt gut mit unserer früheren Abschätzung<sup>[11]</sup> dieses Wertes überein. Die Abschätzung beruht auf der Kombination der Messungen des  $\beta$ -Carotin  $S_1$  0-0 Überganges in PS I ( $14.500 \text{ cm}^{-1}$ ) mit den theoretisch von Damjanovic et al. berechneten Energien angeregter Chlorophyll Zustände<sup>[22]</sup>.

Trotzdem bleibt es rätselhaft, warum die Car  $S_1$  Amplitude der 800 fs Komponente bei den einphotonen Pump-Probe Experimenten im Gegensatz zu den zweiphotonen Pump-Probe



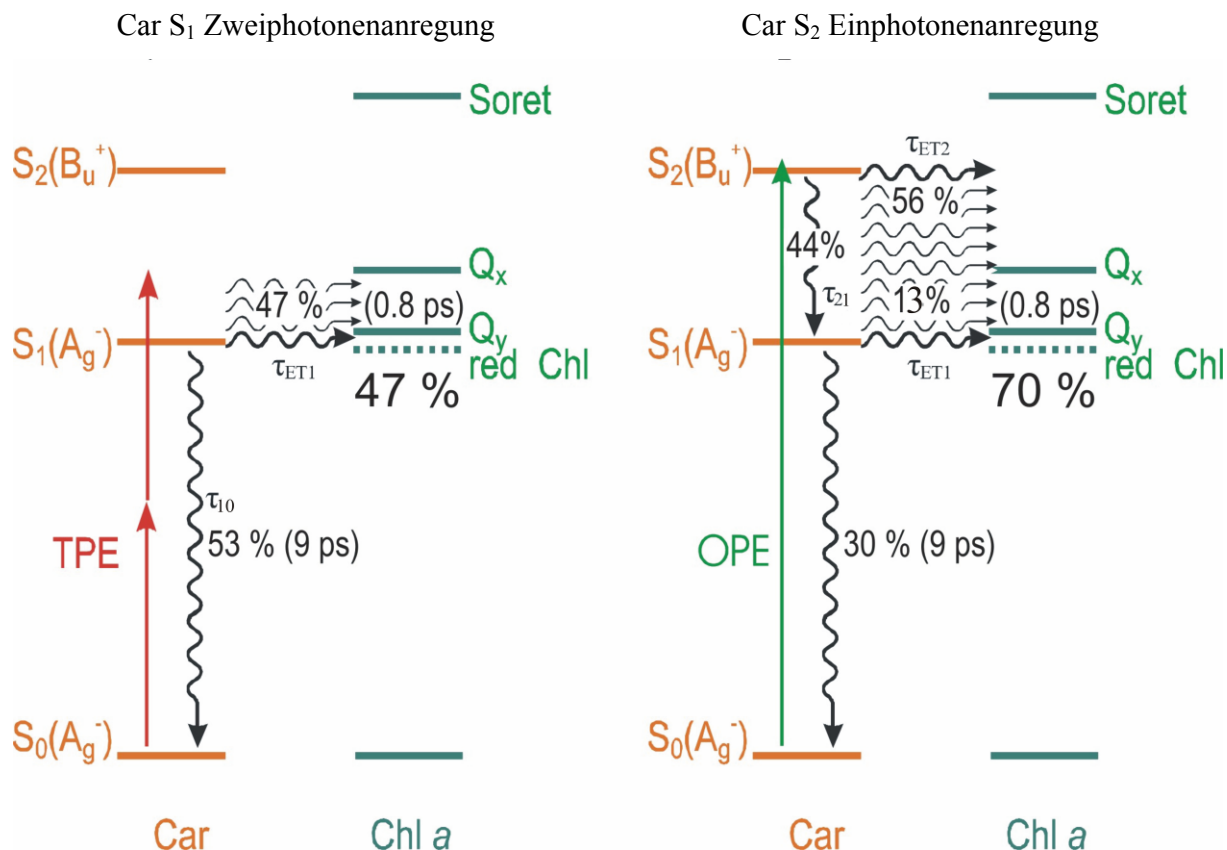
Ergebnissen mit  $28 \pm 5\%$  kleiner ausfällt als erwartet, wobei die Werte noch innerhalb der Fehlertoleranz liegen. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass ein bevorzugter Energietransfer  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Chl}$  genau von den Carotinoiden ausgeht, die auch nach interner Konversion Energie mittels  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Chl}$  Übergang auf die Chlorophylle übertragen (siehe Abbildung 7-7). Eine andere Erklärung für dieses Verhalten sind  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Chl}$  Übergänge aus heißen vibronischen Banden. Diese sehr heißen Banden entstehen nach interner Konversion  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Car } S_1$ . De Weerd<sup>[94]</sup> et al. zeigten, dass die Zunahme der transienten Absorption  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  einer breiten Verteilung folgt, die große Anteile langsamerer Intraband-Komponenten enthält. Diese entsprechen nicht der Zeitkonstante der internen Konversion  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Car } S_1$  und können dementsprechend erst nach erfolgter Intraband-Dynamik der  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Car } S_n$  transienten Absorption detektiert werden. Trotzdem tragen diese sehr heißen vibronischen  $\text{Car } S_1$  Zustände zum Energietransfer auf die Chlorophylle bei. Walla<sup>[10]</sup> et al. zeigten durch theoretische Berechnungen, dass der spektrale Überlapp vom Carotin  $S_1$ -Zustand und Chlorophyllzuständen mit höherer vibronischer Anregung der  $\text{Car } S_1$ -Zustände besser wird.

Allerdings beschreibt die gefundene Bildungseffizienz von  $44 \pm 5\%$  die exakte Population des  $\text{Car } S_1$ -Zustandes, da die verwendete Methode frei von Störungen durch andere Populationsdynamiken ist. Wenn wenigstens 30% der  $\text{Car } S_1$  Population Energie auf die Chlorophylle überträgt, führt dieses zu einer Gesamtquantenausbeute für die Carotinoide im PS I von:

$$\phi_{\text{ET2}} + \phi_{\text{ET1}} \sim (1 - 44\%) + 30\% \cdot 44\% = 69,2 \pm 5\% \quad (25)$$

$\phi_{\text{ET2}}$  und  $\phi_{\text{ET1}}$  bezeichnen hier die Quantenausbeuten für die  $\text{Car } S_2 \rightsquigarrow \text{Chl}$  und  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Chl}$  Energietransfers. Der bestimmte Wert von  $69,2 \pm 5\%$  ist höher, als der von Holt<sup>[92]</sup> et al. vorgeschlagene Wert von  $62 \pm 7\%$ , liegt jedoch innerhalb der Fehlergrenzen. Der von Holt et al. veröffentlichte Wert basierte auf Messungen der Absorption und Fluoreszenz Anregungsspektren bei 77 K. Die tiefe Temperatur der Messungen reduziert wahrscheinlich temperaturabhängige Energietransferwege und erklärt deshalb den geringen Unterschied zwischen beiden Werten. Trotz energetisch nur sehr geringer Unterschiede zwischen  $\text{Car } S_1$  und  $\text{Chl } Q_y$  im Photosystem I, können diese Unterschiede bei allen Messungen bei Raumtemperatur nicht vernachlässigt werden. In Abbildung 7-7 sind die Ergebnisse der Ein- und Zweiphotonenanregung inklusive der ermittelten

Energietransferraten grafisch dargestellt, wodurch die Unterschiede der beiden Messprinzipien noch einmal deutlich werden.



**Abbildung 7-7: Energieniveaudiagramme des Systems Car $\leftrightarrow$ Chl im PS I, in denen die Beiträge des Car  $S_1 \leftrightarrow$  Chl Energietransfers aufgeschlüsselt sind. Nach direkter Zweiphotonenanregung der Carotinoide in vibronisch angeregte  $S_1$ -Zustände werden 47% der Energie auf die Chlorophylle übertragen. Dieser Übergang findet entweder über heiße vibronische Zustände oder wegen hoher Kopplungskonstanten zu benachbarten Chlorophyll a Molekülen statt.**

Nach Einphotonenanregung des Car  $S_2$ -Zustandes, werden 44% der absorbierten Energie auf den tiefer liegenden  $S_1$ -Zustand übertragen und kann über die Amplitude der transienten Absorption detektiert werden. 56% der Anregungsenergie werden über den Car  $S_2$ -Zustand und womöglich auch über sehr hochangeregte Car  $S_1$ -Zustände auf die Chlorophylle übertragen. Diese hochangeregten  $S_1$ -Zustände können durch die transiente Absorption nicht detektiert werden. Von den 44% werden 13% (30% von 44%) über vibronisch angeregte/im vibronischen Grundzustand vorliegende Zustände transferiert. Die Tatsache, dass nicht 47% von 44% transferiert werden, lässt sich dadurch erklären, dass schon ein Teil der Carotinoide, die sonst über interne Konversion in den  $S_1$ -Zustand relaxieren, ihre Energie über den  $S_2$ -Zustand übertragen haben. Eine weitere Möglichkeit sind Übertragungswege aus hochangeregten vibronischen Zuständen, die mit der Probenwellenlänge über die transiente Absorption nicht nachweisbar sind. Zusammengefasst läuft der Car $\rightarrow$ Chl Energietransfer mit einer Effizienz von 70% ab, 13% der Energie wird mindestens über den Car  $S_1$ -Zustand übertragen.

Um zu verdeutlichen, warum schnelle Car S<sub>1</sub> Zeitkonstanten nur verlässlich durch direkte Zweiphotonen Anregung dieses „verbotenen“ Zustandes detektiert werden können, wurde ein einfaches kinetisches Modell entwickelt. Es besteht aus einem aufeinander folgenden Reaktionsschema eines Carotins mit drei Energiezuständen:

$$\frac{d[S_2](t)}{dt} = -(k_{ET2} + k_{21}) \times [S_2](t) \quad (26)$$

$$\frac{d[S_1](t)}{dt} = +k_{21} \times [S_2](t) - (k_{ET1} + k_{10}) \times [S_1](t) \quad (27)$$

Hierbei beziehen sich [S<sub>1</sub>](t) und [S<sub>2</sub>](t) auf die zeitabhängigen Populationen des Car S<sub>1</sub> und Car S<sub>2</sub>-Zustandes,  $k_X$  ist die jeweilige Geschwindigkeitskonstante der Zeitkonstante  $\tau_X$  mit den entsprechenden Energietransferwegen aus Abbildung 7-1,  $k_{10}$  stellt die Geschwindigkeitskonstante für die Car S<sub>2</sub>  $\rightsquigarrow$  Car S<sub>1</sub> interne Konversion dar und  $t$  die Zeit. Die Anfangsbedingungen für eine Einphotonenanregung des S<sub>2</sub> Zustandes sind:

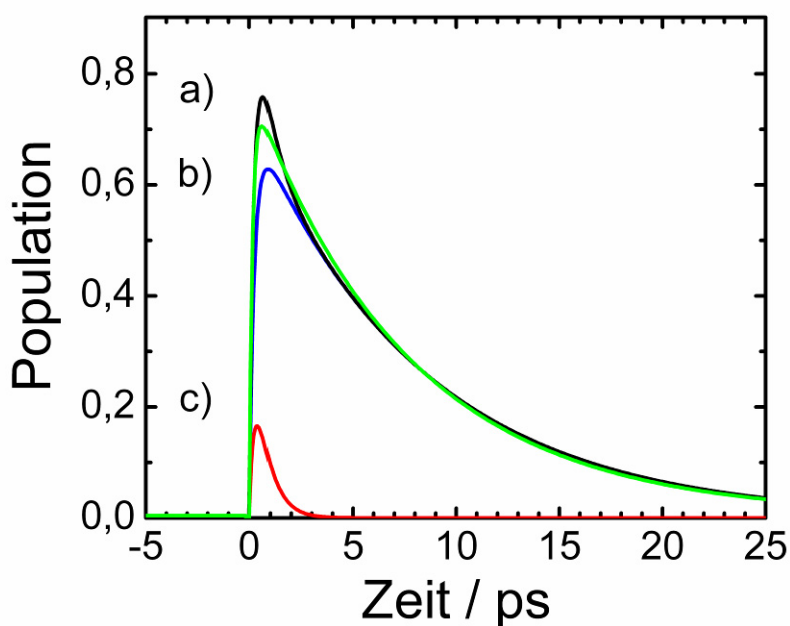
$$[S_2](0) = 1 \quad (28)$$

$$[S_1](0) = 0 \quad (29)$$

Die Lösung für diesen Fall lautet:

$$[S_1](t) = \frac{k_{21} \times \left( -e^{-(k_{ET2} + k_{21})t} + e^{-(k_{ET1} + k_{10})t} \right)}{k_{21} + k_{ET2} - k_{ET1} - k_{10}} \quad (30)$$

Langsame ( $> \sim 1$  ps) Car S<sub>1</sub> Entvölkerungen können nach einer Car S<sub>2</sub> Anregung leicht detektiert werden, da der Anstieg des S<sub>1</sub>-Zustandes zu einem gut nachweisbaren Ereignis führt. In Abbildung 7-8 sind diese Zustände als blaue Kurve dargestellt.



**Abbildung 7-8:** Schwarze Kurve: berechnete Zeitabhängigkeit der Gesamtbevölkerung des Car  $S_1$ -Zustandes, bestehend aus 30% der Carotinoide, die aktiv Energie transferieren ( $k_{ET1}^{-1} \sim 0,8$  ps) und 70%, die dieses nicht machen ( $k_{I0}^{-1} = 8,3$  ps). Blaue Kurve: Korrespondierende Kurve der 70% Fraktion, die keine Energie transferiert. Rote Kurve: Korrespondierende Kurve der 30% Fraktion, die Energie auf die Chlorophylle transferiert, mit  $(k_{ET2} + k_{21})^{-1} = 0,25$  ps. Grüne Kurve: Biexponentieller Datenfit der schwarzen Kurve mit einer Zeitkonstante  $\tau_2 = 7,7$  ps $^{-1}$ . Dieser Wert gleicht dem  $\tau_{I0} = k_{I0}^{-1} = 8,3$  ps Wert, der ohne jeglichen Energietransfer von  $S_1$ -Zuständen auf die Chlorophylle entsteht.

Im Gegensatz dazu, sind die schnellen 30% Anteile der Entvölkerung des  $S_1$ -Zustandes mit einer Zeitkonstante von 800 fs als rote Kurve in der Abbildung dargestellt. Dieser Anteil liefert nur einen kleinen Beitrag zur Gesamtfunktion, die als schwarze Kurve dargestellt ist und eine genaue Analyse der korrespondierenden Kinetik erfordert. Als Anhaltspunkt wurde die schwarze Kurve biexponentiell gefittet (grüne Kurve) und dabei wird ersichtlich, dass absolut hochwertige Messdaten erforderlich sind, um die schnell abfallende Komponente zuverlässig zu detektieren. Da dieses aber gerade bei biologischen Proben denkbar schwer zu erreichen ist, verdeutlicht dieses einfache Modell den Zusammenhang der beteiligten Energiezustände und die breite Streuung der veröffentlichten Messwerte der schnellen Carotindynamik in der Photosynthese.

In diesem Kontext ist es wichtig anzumerken, dass es nicht darauf ankommt, ob die schnellen Car  $S_1$ -Zustände hochangeregte vibronische Zustände darstellen, oder einfach einen Teil der Carotinoide darstellen, die über eine besonders große Car  $S_1 \rightsquigarrow$  Chl Kopplungskonstante verfügen. Die Car  $S_1$ -Zustände mit einer längeren Lebensdauer stellen entweder  $S_1$ -Zustände

im vibronischen Grundzustand dar, die sonst effizient über hochangeregte vibronische Zustände Energie übertragen oder Energiezustände von Carotinoiden, die über keine Kopplungen zu den benachbarten Chlorophyllen verfügen.

## 8 Zweiphotonen-Fluoreszenzmessungen an lebenden Pflanzen

### 8.1 Einführung

Die Messung von Chlorophyll a Fluoreszenz ist eine weit verbreitete Möglichkeit, Aussagen von Energietransfermechanismen in Photosystemen zu treffen<sup>[34]</sup>. Durch den Zusammenhang aus Fluoreszenzintensität, Photochemie und Wärmerelaxation in Abhängigkeit der eingestrahlten Lichtintensität (siehe auch Abbildung 4-1), ist man in der Lage durch Messung der Fluoreszenz, Aussagen über Energieflüsse in lebenden Pflanzen zu formulieren.

Hierbei dient die Wärmerelaxation oder auch nichtphotochemisches Quenching (NPQ) genannt, der Pflanze dazu, überschüssige Energie bei zu hoher Lichtintensität als Wärme an die Umgebung abzugeben<sup>[40,100]</sup>. Die Mitwirkung der Carotinoide des Xanthophyll Zyklus des Lichtsammelkomplexes II an diesem Prozess gilt mittlerweile als allgemein akzeptiert<sup>[34]</sup>.

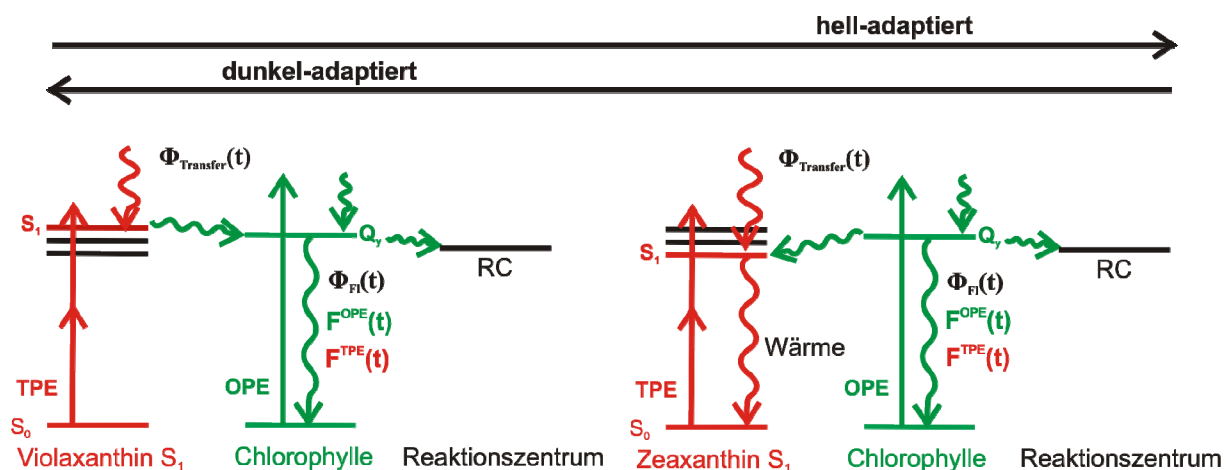
Der Startmechanismus für diesen Prozess ist ein durch Starklicht generierter pH-Gradient in der Thylakoidmembran, der das Enzym Violaxanthin-deepoxidase (VxDE) aktiviert, das gezielt und reversibel das Carotin Violaxanthin (Vio) über Antheraxanthin in Zeaxanthin (Zea) überführt<sup>[49,101]</sup>. Durch diese Umwandlungen verändern sich die beteiligten Carotinoide strukturell und energetisch in Bezug auf ihre angeregten Zustände.

Das unter Starklicht gebildete Zeaxanthin ist planar und behindert dadurch sterisch nicht mehr mögliche strukturelle Änderungen des Komplexes<sup>[102,103]</sup>. Zusätzlich kommt es zu einer Vergrößerung von 9 auf 11 konjugierte Doppelbindungen des Systems, was spektroskopisch zu einer energetischen Absenkung der angeregten Zustände führt. Holt et al. beschrieben im starklichtadaptierten Zustand weiterhin die Bildung von Carotinoid-Radikal-Kationen, welche die aktive Rolle der Carotinoide während des Quenching-Prozesses unterstützen<sup>[37-39]</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass ein kleineres peripheres Antennen-Protein mit der Bezeichnung PsbS des PS II/LHC II Superkomplexes eine wichtige Rolle im Quenching-Prozess spielt<sup>[104]</sup>. Die Untersuchungen zeigten, dass in Mutanten, die das PsbS Protein nicht enthalten, kein nichtphotochemisches Quenching möglich ist. Bisher ist jedoch keine genaue Position des Proteins bekannt<sup>[105]</sup>, so dass der genaue Ort des Quenchings unbekannt bleibt.

Der Adaptionsprozess zum helladaptierten Zustand wird zusätzlich von einer Absorptionsänderung bei 533 nm begleitet, die Ursache hierfür kann in strukturellen

Änderungen, Aktivierungen von Zeaxanthin Bindungsstellen oder Protonierung eines oder mehrerer Untereinheiten des PS II liegen<sup>[105-108]</sup>.

Die vorgestellten Modelle beschreiben zwar die Prozesse, die unter Starklichteinfluss in einer Pflanze ablaufen, doch die eigentliche Energieableitung mit Hilfe der Pigmente bleibt wiederum ungeklärt. Frank et al. postulierten hierfür den molekularen Schaltmechanismus (molecular gear shift model) der Xanthophylle<sup>[65,109]</sup>. Durch Vergrößerung des konjugierten  $\pi$ -Systems von 9 Doppelbindungen in Violaxanthin auf 11 Doppelbindungen in Zeaxanthin werden die Energien der angeregten Zustände abgesenkt. Der Vergleich der Energien der  $S_1$ -Zustände der Xanthophylle mit der Energie des  $S_1$ -Zustands von Chlorophyll a (Chl a  $\sim 14.880 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[110]</sup> zeigt die Ähnlichkeit beider Energien. Das Modell des molekularen Schaltmechanismus geht davon aus, dass die  $S_1$ -Energie von Violaxanthin oberhalb der des Chlorophylls und die  $S_1$ -Energie von Zeaxanthin unterhalb dieser Energie liegt. Hierdurch kann sich die Richtung des Energieflusses umkehren. Abbildung 8-1 verdeutlicht diesen Zusammenhang mit Hilfe von Energieniveauschemata.



**Abbildung 8-1: Schematische Darstellung des molekularen Schaltmechanismus. In Abhängigkeit von der Lichtintensität wird der  $S_1$ -Zustand der Xanthophylle energetisch abgesenkt oder angehoben. Dadurch kann entweder Energie von den Carotinoiden auf die Chlorophylle übertragen werden (dunkeladaptiert), oder die Überschussenergie von den Chlorophyllen auf die Carotinoide übertragen werden und von dort als Wärme abgegeben werden.  $\Phi_{\text{Transfer}}(t)$  bezeichnet die Quantenausbeute des Energietransfers für den Übergang vom Carotin auf Chlorophyll a und  $\Phi_{\text{Fl}}(t)$  die Fluoreszenzquantenausbeute.  $F^{\text{OPE}}(t)$  ist die Fluoreszenzintensität nach Einphotonenanregung und  $F^{\text{TPE}}(t)$  die Fluoreszenzintensität nach Zweiphotonenanregung der Xanthophylle.**

Die Energien der ersten angeregten Zustände der Xanthophylle wurden in der Literatur mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt<sup>[14]</sup>. Die Ergebnisse dieser Messungen der Car  $S_1$  Energien der jeweiligen Spezies sind in Tabelle 8-1 dargestellt. Bei den Werten ist die starke

Abweichung von mehr als  $500\text{ cm}^{-1}$  auffallend, welche durch die experimentell schwierige Bestimmung der einphotonen-verbotenen Zustände bedingt ist<sup>[43]</sup>.

| Violaxanthin                    | Zeaxanthin                      | Literatur             | Jahr              |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------|
| $15.290\text{ cm}^{-1}$         | $14.170\text{ cm}^{-1}$         | Lit. <sup>[111]</sup> | 1996 <sup>a</sup> |
| $14.470 \pm 90\text{ cm}^{-1}$  | $14.030 \pm 90\text{ cm}^{-1}$  | Lit. <sup>[112]</sup> | 1999              |
| $14.880 \pm 90\text{ cm}^{-1}$  | $14.550 \pm 90\text{ cm}^{-1}$  | Lit. <sup>[109]</sup> | 2000              |
| $13.900 \pm 300\text{ cm}^{-1}$ | $13.900 \pm 300\text{ cm}^{-1}$ | Lit. <sup>[113]</sup> | 2002 <sup>b</sup> |
| $15.580 \pm 60\text{ cm}^{-1}$  | $14.610 \pm 40\text{ cm}^{-1}$  | Lit. <sup>[110]</sup> | 2002 <sup>c</sup> |

**Tabelle 8-1: Zusammenfassung der veröffentlichten Energien der  $S_1$ -Zustände von Violaxanthin und Zeaxanthin.**

Die große Variation dieser Messwerte und die Ungewissheit der exakten Energien der Carotin  $S_1$ -Zustände in intakten und unveränderten Pigment-Proteinkomplexen erlaubt keine eindeutige Schlussfolgerung über den möglichen Anteil des molekularen Schaltmechanismus am nichtphotochemischen Quenching.

Die experimentelle Analyse des molekularen Schaltmechanismus kann aber auch durch zeitliche Einflüsse erschwert sein. Wenn der Prozess der Energieübertragung von den Chlorophyllen auf die Carotinoide auf einer ähnlichen oder längeren Zeitskala abläuft, als die Zeit der internen Konversion von Zea  $S_1 \rightsquigarrow$  Zea  $S_0$  von  $10\text{ ps}$ <sup>[14]</sup>, bleibt die Population des  $S_1$ -Zustandes permanent undetektierbar klein.

Aus diesen Gründen sind Experimente erforderlich, die eine Änderung des Carotin-Chlorophyll Energietransfers aufdecken und damit eine Zuordnung von Fluoreszenzparametern auf einzelne Parameter des komplexen Systems zulassen. Die Methode der Zweiphotonenanregung der Carotinoid  $S_1$ -Zustände bietet auch hier die Möglichkeit für einen direkten Eingriff in das System, ohne die Umwege von  $S_2$ -Anregungen zu gehen und so die Beteiligung eines angeregten Zustandes am Vorgang des nichtphotochemischen Quenchings aufzudecken.

<sup>a</sup> abgeschätzt über die energy-gap-law Methode, <sup>b</sup> aus wiederhergestellten LHC II Komplexen mit nur einer Carotinoid-Spezies, <sup>c</sup> bei 77 K in EPA-Glas

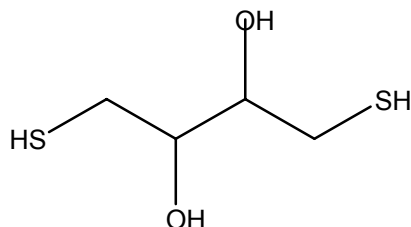


## 8.2 Probenvorbereitung und experimentelle Durchführung

Um die Homogenität der Messungen zu gewährleisten, wurden diese mit unterschiedlichen Freiland Gras- und Schilfsorten durchgeführt. Als Referenzpflanze wurden Blätter von *Arabidopsis thaliana* vermessen, die in einem Klimaschrank unter Normbedingungen gezogen wurde. Alle Blätter oder ganze Pflanzenteile wurden frisch geschnitten und sofort gewässert. Um Lufteinschlüsse innerhalb der Blattkapillaren zu verhindern wurden Freilandpflanzenteile im Labor unter Wasser noch einmal gekürzt. Alle verwendeten pflanzlichen Proben wurden jeweils morgens eingesammelt, um längerfristige Quenching-Prozesse (qI), die sehr lange Dunkeladaptionsphasen zur Regeneration benötigen, zu verhindern. Alle Pflanzenteile wurden von Juni bis Oktober in und um Braunschweig gesammelt.

Vor jeder Messung fand eine Dunkeladaption von 30 min Dauer statt, um eine maximale Anzahl von PS II Reaktionszentren (P680) im Grundzustand zu erhalten. Die Anregung der Blattpigmente erfolgte abwechselnd bei 1150 nm (TPE) bzw. 575 nm (TPE/2 = OPE) mit einer Intensität der Einphotonenanregung von  $\sim 2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Diese Intensität entspricht einer sättigenden aktinischen Intensität, die in der Pflanze Quenching-Mechanismen initialisiert<sup>[34]</sup>. Aus früheren Arbeiten von Walla<sup>[9]</sup> et al. war das zweiphotonen Anregungsspektrum von LHC II bekannt und die zweiphotonen Anregungswellenlänge für diese Messungen wurde so gewählt, dass absichtlich höhere vibronische  $S_1$ -Zustände der Carotinoide angeregt wurden. Die Intensität der Zweiphotonenanregung lag zeitlich gemittelt bei 2 mW und führte zu gleichen oder ähnlichen Mengen angeregter Carotinmoleküle  $I_{Abs}^{TPE}$ , wie die Einphotonenanregung bei den Chlorophyllen  $I_{Abs}^{OPE}$ . Dieses wurde dadurch abgeschätzt, dass beide Fluoreszenzintensitäten miteinander verglichen wurden und eine Energieübertragunseffizienz der Carotinoide auf die Chlorophylle Car  $S_1 \rightsquigarrow$  Chl  $Q_y$  von  $\sim 10\text{--}30\%$  im dunkeladaptierten Zustand angenommen wurde. Die verbleibende Chlorophyllfluoreszenz  $F'_M$  nach Anregung mit beiden Methoden war nach  $t \sim 500$  s kleiner als 20-30% der maximalen Anfangsfluoreszenzintensität  $F_M$  bei 685 nm. Es wurde viel Wert auf den räumlich fokalen Überlapp beider Anregungsstrahlen gelegt, um zu gewährleisten, dass in beiden Fällen das untersuchte Blatt an derselben Stelle angeregt wurde. Hierzu wurden die Blätter mittels Magneten auf der Stahl-Linearstange befestigt, um so eine möglichst gestraffte homogene und glatte Oberfläche zu erzeugen. Für Messungen mit dem Enzym-

Inhibitor Dithiothreitol (DTT, Abbildung 8-2) wurden die Pflanzenteile für vier Stunden in eine wässrige DTT-Lösung ( $c = 20 \text{ mMol/L}$ ) getaucht und währenddessen einem starken Luftzug ausgesetzt, um die Blattverdunstung zu erhöhen.



**Abbildung 8-2: Strukturformel des Enzym Deaktivators Dithiothreitol. Er greift selektiv in den Xanthophyll-Zyklus ein, indem er das Enzym Violaxanthin-deepoxidase (VxDE) ausschaltet.**

DTT inhibiert die Violaxanthin-deepoxidase (VxDE) des Xanthophyll-Zyklus, ohne die eine Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin nicht möglich ist<sup>[114-116]</sup>.

Normalerweise werden Pflanzenparameter wie der Zustand der Pflanze oder die Parameter der Quenching-Prozesse über konventionelle Einphotonenanregungen (OPE) der Chlorophylle und Detektion der Fluoreszenzintensität  $F^{OPE}(t)$  bestimmt<sup>[55,117]</sup>.  $F^{OPE}(t)$  ist hierbei proportional zum Anteil (Fluoreszenz Quantenausbeute,  $\Phi_{Fl}(t)$ ) der Chlorophyll Anregungsenergie, der nicht durch photochemisches Quenching des Reaktionszentrums oder andere Prozesse abgefangen wurde.

$$F^{OPE}(t) = I_{Abs}^{OPE} \cdot \Phi_{Fl}(t) \quad (31)$$

$I_{Abs}^{OPE}$  stellt die Lichtintensität bzw. die Anzahl der von den Pigmenten absorbierten Photonen dar. Bei Bestrahlung der Photosysteme mit sättigendem aktinischem Licht stellt  $F^{OPE}(t)$  genau den Anteil der Anregungsenergie dar, der nicht durch nichtphotochemische Quenching-Prozesse umgesetzt wurde. Das nichtphotochemische Quenching wird hierbei auch durch eine kurze Anstiegskomponente von 0,4 ns der Fluoreszenzlebensdauer angezeigt<sup>[50,107]</sup>.

Die beobachtete Chlorophyll a Fluoreszenz nach selektiver Zweiphotonenanregung (TPE) der Carotinoide  $F^{TPE}(t)$  ist zusätzlich noch proportional zum Anteil der Anregungsenergie  $\Phi_{Transfer}$ , der von den Carotinoiden auf die Chlorophylle übertragen wird  $\text{Car } S_1 \rightsquigarrow \text{Chl } Q_y$ :

$$F^{TPE}(t) = I_{Abs}^{TPE} \cdot \Phi_{Transfer}(t) \cdot \Phi_{Fl}(t) \quad (32)$$

Hierbei stellt  $I_{Abs}^{TPE}$  die Lichtintensität oder Anzahl der Photonen dar, die von den Carotinoiden nach Zweiphotonenanregung absorbiert wurden.

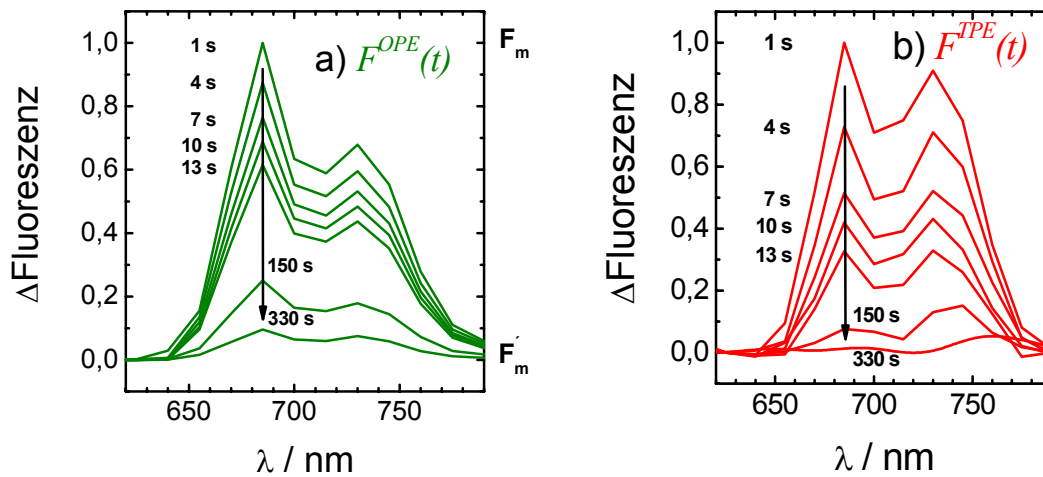
Dies bedeutet, wenn der Quotient aus

$$\Phi_{Transfer}(t) \propto \frac{F^{TPE}(t)}{F^{OPE}(t)} \quad (33)$$

während des Adaptionprozesses kleiner oder größer wird, verkleinert oder vergrößert sich der Energieübertragungsprozess von den Carotinoiden auf die Chlorophylle Car S<sub>1</sub> ↔ Chl Q<sub>y</sub>. Ein Grundgesetz von Energietransferprozessen zwischen zwei benachbarten Molekülen ist, dass die Flussrichtung der Energie nur von den relativen Energien der beteiligten Zustände abhängt<sup>[76,77,118,119]</sup>. Das heißt, wenn sich  $\Phi_{Transfer}(t)$  verkleinert, kehrt sich die Richtung des Energieflusses innerhalb der Photosynthese solange um (Car S<sub>1</sub> ↔ Chl Q<sub>y</sub>), bis die Carotinoide von den Chlorophyllen strukturell vollständig entkoppelt sind.

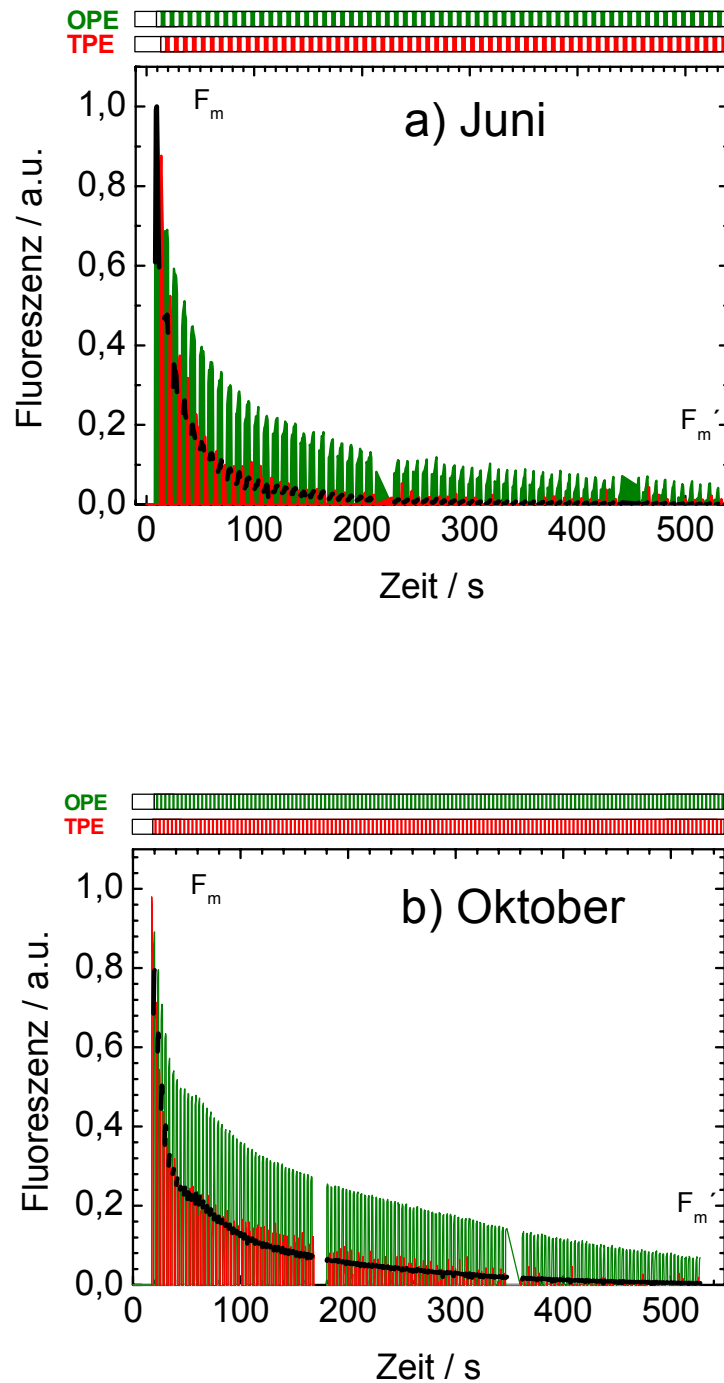
### 8.3 Ergebnisse

Die Abbildungen 8-3 a) und b) zeigen die zeitabhängigen Fluoreszenzspektren von abwechselnd Ein- bzw. Zweiphotonenanregungen der exakt gleichen Blattstelle während der Starklichtadaption. Die einzelnen Spektren sind in der Anfangsphase in zeitlichen Abständen von 3 s dargestellt.



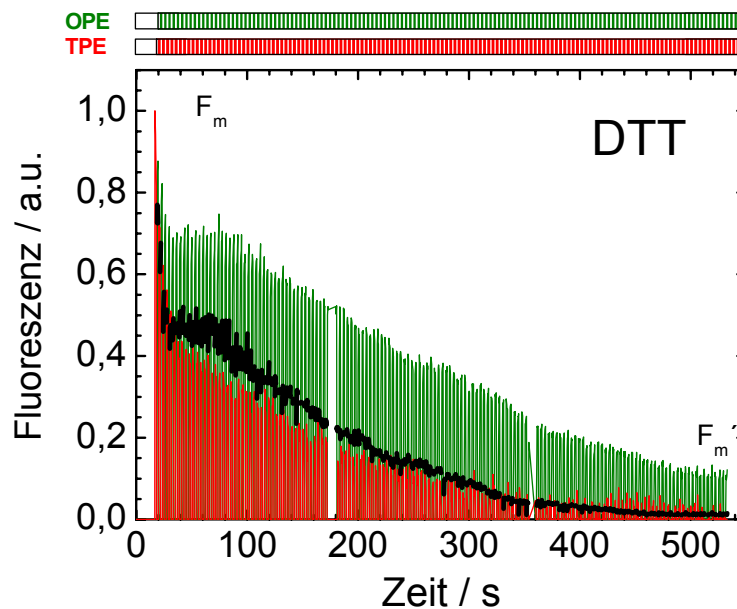
**Abbildung 8-3: Darstellung der nach Dunkeladaption aufgenommenen zeitabhängigen Fluoreszenz-Differenzspektren nach a) Einphotonenanregung der Chlorophylle ( $F^{OPE}(t)$ ,  $\lambda_{Exc} = 575 \text{ nm}$ ,  $\sim 2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta\text{Fluoreszenz} = F(t) - F(500 \text{ s})$ ) und b) Zweiphotonenanregung der Carotinoide ( $F^{TPE}(t)$ ,  $\lambda_{Exc} = 2 \cdot 575 \text{ nm} = 1150 \text{ nm}$ ). Die Datenaufnahme erfolgte abwechselnd unter besonderer Beachtung, dass bei beiden Anregungen dieselbe Blattstelle angeregt wurde.**

Die konzertierte zeitabhängige Aufnahme ganzer Fluoreszenzspektren hat den Vorteil, das Maximum des Bulk-Peaks der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 685 nm zeitabhängig darstellen zu können, ohne auf spektrale Fluoreszenzinformationen verzichten zu müssen. Die Abbildungen 8-4 a) und b) zeigen die korrespondierenden zeitaufgelösten Abfälle der Chlorophyll-Fluoreszenz jeweils von  $F^{OPE}(t)$  und  $F^{TPE}(t)$  des Bulk-Maximums bei unterschiedlichen Jahreszeiten. Aus den Abbildungen ist eindeutig ersichtlich, dass die durch die Carotinoidanregung hervorgerufene Chlorophyll-Fluoreszenz  $F^{TPE}(t)$  viel schneller abfällt, als die korrespondierende durch direkte Chlorophyllanregung hervorgerufene Fluoreszenz  $F^{OPE}(t)$ . Der Abfall von  $F^{TPE}(t)$  ist bereits nach 330 s abgeschlossen, während bei  $F^{OPE}(t)$  ein weiterer Abfall zu beobachten ist. Dieses Ergebnis demonstriert eindeutig, dass ein Großteil des  $\text{Car S}_1 \rightsquigarrow \text{Chl Q}_y$  Energietransfers  $\Phi_{Transfer}(t)$  während der Starklichtadaption der Pflanzen schnell abfällt. Die Carotinoide, die zuvor Energie auf die Chlorophylle übertragen haben, nehmen jetzt Energie von den Chlorophyllen auf ( $\text{Car S}_1 \leftarrow \text{Chl Q}_y$ ), bis sie vollständig strukturell von den benachbarten Chlorophyll-Pigmenten entkoppelt sind.



**Abbildung 8-4:** Beispiele zeitabhängiger Bulk-Fluoreszenz (685 nm), erzeugt durch abwechselnde Chlorophyll Einphotonen- (FOPE(t),  $\lambda_{Exc} = 575$  nm, grüne Daten) und Carotin Zweiphotonenanregung (FTPE(t),  $\lambda_{Exc} = 2 \cdot 575$  nm = 1150 nm, rote Daten) eines Schilfblattes, welches a) im Juni und b) im Oktober in Braunschweig geschnitten wurde. Alle Daten wurden auf  $F(0) = 1$  und  $F(\infty) = 0$  normiert. Die schwarzen Daten wurden durch  $F^{OPE}(t)^2$  berechnet (Rel. 34). Unterbrechungen innerhalb der Daten stammen vom limitierenden Datenpuffer der CCD-Kamera Software. Die Anregungsintensitäten entsprechen den oben definierten.

Die Messungen wurden in einem Zeitraum von Mai bis Oktober 2005 etwa 30-mal wiederholt. Als Proben wurden Pflanzenteile und Blätter verschiedenster Gräser und Schilfsorten sowie *Arabidopsis thaliana* als Referenzpflanze verwendet. Es gibt in allen Fällen eine qualitative Übereinstimmung, in über 80% der vermessenen Proben kommt es zu einem Abfall von  $\Phi_{Transfer}(t)$  während der Starklichtadaption. Abbildung 8-5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz eines Blattes, das vor der Messung mit DTT behandelt wurde. In diesem Fall sieht man deutlich, dass die zeitlichen Verhalten beider Fluoreszenzkurven  $F^{OPE}(t)$  und  $F^{TPE}(t)$  stark verlangsamt sind.



**Abbildung 8-5:** Messung von zeitabhängiger Bulk-Fluoreszenz (685 nm) eines Blattes, das zuvor mit DTT behandelt wurde (4 St., 20 mM). Sonstige Messbedingungen unverändert. Fluoreszenz durch TPE der Carotinoide in rot, Fluoreszenz durch OPE der Chlorophylle in grün dargestellt. Die schwarzen Daten wurden durch  $F^{OPE}(t)^2$  berechnet.

Im Modell des molekularen Schaltmechanismus (molecular gear shift model) laufen zwei gegenläufige Prozesse genau gleichzeitig ab. Das maximale Ausmaß, in dem der Quenching-Mechanismus die für die Fluoreszenz zur Verfügung stehende Energie  $\Phi_{Fl}(t)$  herabsetzen kann, ist direkt mit der Amplitude und der Zeitabhängigkeit der Energieübertragung der Carotinoide auf die Chlorophylle  $\Phi_{Transfer}(t)$  und somit des entgegengesetzten Prozesses verbunden. Daraus folgt, dass wenn  $\Phi_{Fl}(t)$  und  $\Phi_{Transfer}(t)$  in gleichem Maße zurückgehen,

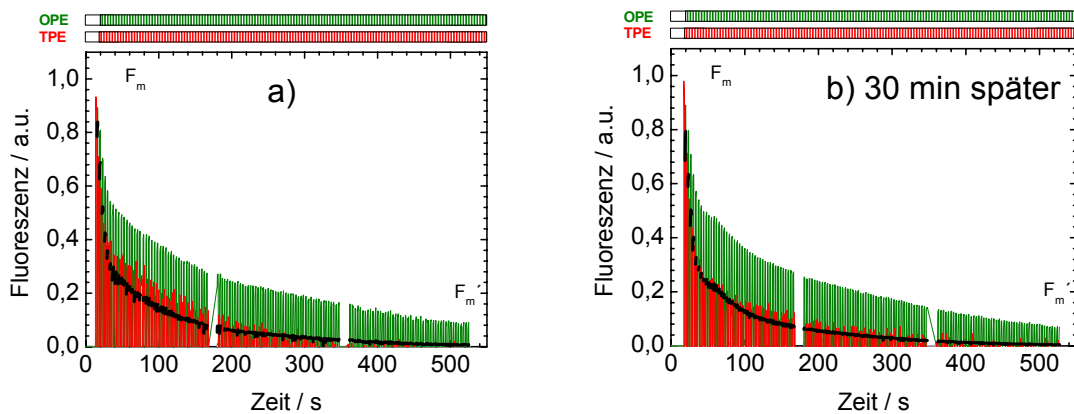
eine quadratische Abhängigkeit zwischen den normierten und zeitabhängigen Teilen von OPE- und TPE-Fluoreszenzkinetik besteht:  $F(t) \propto \Phi_{Fl}(t)$  und

$$F^{TPE}(t) \propto \Phi_{Transfer}(t) \cdot \Phi_{Fl}(t) \approx \Phi_{Fl}(t)^2 \Rightarrow$$

$$\frac{F^{TPE}(t) - F^{TPE}(\infty)}{F^{TPE}(0)} \approx \left( \frac{F(t) - F(\infty)}{F(0)} \right)^2 \quad (34)$$

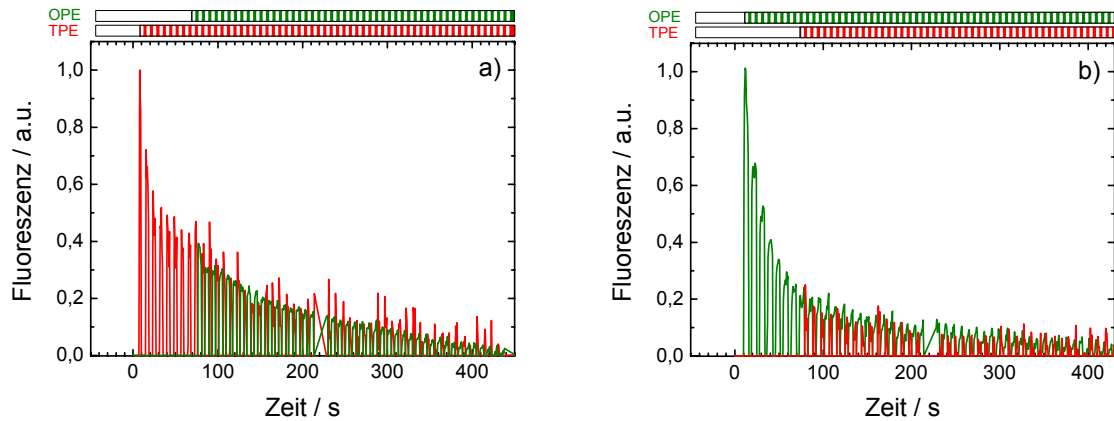
Diese Relation stimmt mit den meisten Messdaten gut überein (schwarze Kurven in den Abbildungen 8-4 und 8-5) und unterstützt damit die enge Beziehung zwischen dem Anwachsen des Xanthophyll-Zyklus abhängigen Energie-Quenchings mit dem gleichzeitigen Abfall der Energieübertragung durch die Carotin  $S_1$ -Zustände auf die Chlorophylle.

Zur Überprüfung der Messmethode wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um auszuschließen, dass die Unterschiede in den beobachteten Fluoreszenzkinetiken auf Ausbleicheffekten in den vermessenden Pflanzenteilen, energetischen Unterschieden bezüglich Anregungsenergie oder Anregungswahrscheinlichkeiten beruhen. Abbildung 8-6 zeigt Wiederholungsmessungen an derselben Stelle eines Schilfblattes mit einer dazwischen liegenden Dunkeladapionsphase von 30 Minuten unter sonst identischen Bedingungen.



**Abbildung 8-6: Wiederholungsmessung an der gleichen Blattstelle eines Schilfblattes mit dazwischen liegender Dunkeladapionsphase von 30 Minuten. In beiden Fällen sind die Veränderungen von  $F^{TPE}(t)$  (rote Daten) nach einer Zeitspanne von 350 Sekunden abgeschlossen, während bei  $F^{OPE}(t)$  auch nach 550 Sekunden noch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen ist. Die Anregungsenergien entsprechen den oben angegebenen.**

Abbildung 8-7 verdeutlicht, dass der Betrag der Anregungsenergie durch Zweiphotonenanregung nicht größer ist als bei der Einphotonenanregung. Dadurch kann der schnellere Abfall von  $F^{TPE}(t)$  nicht durch höhere TPE-Intensitäten verursacht werden. Die experimentelle Umsetzung hierbei erfolgte bei a) durch TPE mit verspätet nachgeschalteter OPE und bei b) andersherum.



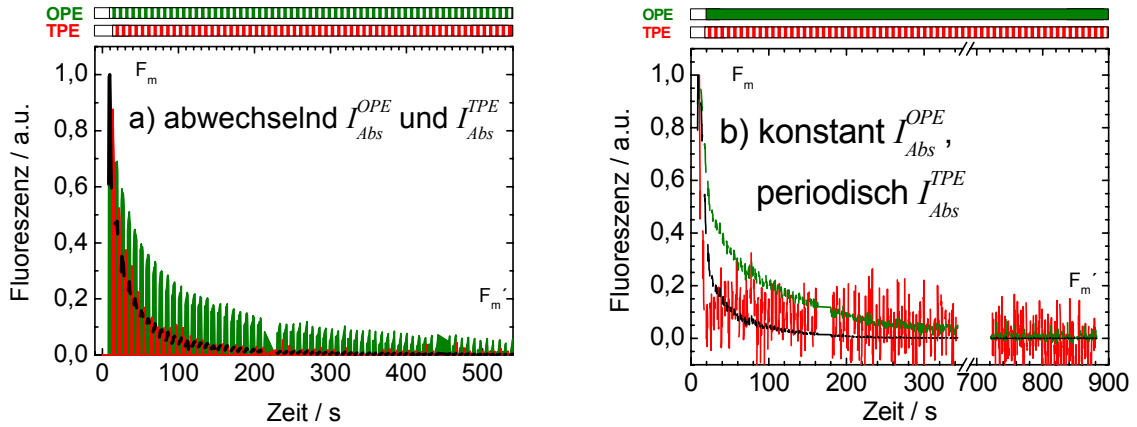
**Abbildung 8-7: Vergleich von Messungen, bei denen erst TPE ( $F^{TPE}(t)$ , rote Kurven) und dann OPE ( $F^{OPE}(t)$ , grüne Kurven) zugeschaltet wurde a) und andersherum b). Für bessere Übersichtlichkeit wurden die jeweils nachfolgenden Fluoreszenzkurven auf die entsprechenden Kurven der Erstanregung normiert. Die Anregungsenergien entsprechen den oben angegebenen.**

Um zusätzlich auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede der beiden Anregungsmethoden auf kleinere Anregungswahrscheinlichkeiten bei der Zweiphotonenanregung zurückzuführen sind, wurden die Messungen mit einer anderen Methode wiederholt.

Hierbei wurde die permanente OPE mit einer signifikant kleineren periodischen TPE überlagert. Dieses garantiert eine sehr gleichartige Anregungs-Übergangswahrscheinlichkeit der Pflanzen während der gesamten Messperiode.  $F^{TPE}(t)$  konnte aus der kleinen periodischen Variation des Fluoreszenzsignals herausgerechnet werden.  $F^{OPE}(t)$  und  $F^{TPE}(t)$  zeigen auch hier einen sehr schnellen Abfall in der Energietransfer-Quanteneffizienz  $\Phi_{Transfer}(t)$  und eine angemessene Übereinstimmung mit der Relation (34) (schwarze Kurve).

Abbildung 8-8 zeigt die Ergebnisse der Messung in Vergleich zu einer Messung mit abwechselnden Anregungen von TPE und OPE. Wegen des schlechten Signal- zu Rauschverhältnisses der überlagerten Messungen wurden allerdings die meisten Messungen mit abwechselnden Anregungen durchgeführt.





**Abbildung 8-8:** Vergleich von zwei Messungen mit a) abwechselnden TPE und OPE Anregungen und b) konstanter OPE und periodisch überlagerter, schwächerer TPE.

## 8.4 Diskussion der Ergebnisse

Anhand der Ergebnisse stellt sich die Frage, welcher Anteil der Gesamtmenge an Carotinoiden für die beobachtete Fluoreszenz  $F^{TPE}(t)$  und damit auch für die zeitabhängigen Werte für  $\Phi_{Transfer}(t) \propto F^{TPE}(t)/F^{OPE}(t)$  verantwortlich ist.

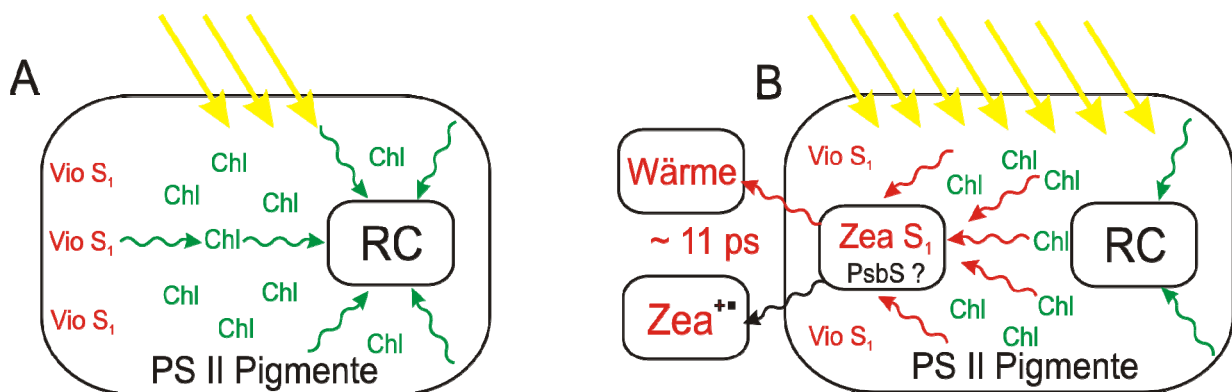
Nur die Carotinoide, die eine hohe Transferrate des  $\text{Car S}_1 \rightsquigarrow \text{Chl Q}_y$  Energietransfers besitzen, sind für die detektierte Chlorophyll a Fluoreszenz verantwortlich. Das ist allerdings nur eine kleine Anzahl der Carotin-Gesamtpopulation, beispielsweise alle Carotinoide, die wie Violaxanthin und Neoxanthin nicht mehr als neun konjugierte Doppelbindungen besitzen. Vorausgesetzt, dass das Modell des molekularen Schaltmechanismus nicht zutrifft, gäbe es bei  $\Phi_{Transfer}(t) \propto F^{TPE}(t)/F^{OPE}(t)$  während der Starklichtadaption keine signifikanten Änderungen. Auch unter der Annahme, dass die Carotinoide des Xanthophyll-Kreislaufes nur sehr wenig zu der über TPE angeregten Fluoreszenz  $F^{TPE}(t)$  beitragen, würde das ebenfalls nur kleine Änderungen von  $\Phi_{Transfer}(t)$  bedeuten.

Aus den gemessenen Daten geht aber hervor, dass es zu einem signifikanten Abfall von  $\Phi_{Transfer}(t) \propto F^{TPE}(t)/F^{OPE}(t)$  während der Starklichtadaption kommt. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass der gesamte Rückgang des  $\text{Car S}_1 \rightsquigarrow \text{Chl Q}_y$  Energietransfers damit erklärt werden kann, dass die Carotinoide, die vorher an der Entstehung von  $F^{TPE}(t)$  beteiligt waren, nun strukturell entkoppelt sind.

Eine mögliche Erklärung dieses Vorgangs in Pflanzen ist, dass der größte Anteil von den am Anfang Energie transferierenden Carotinoiden, zum Beispiel Violaxanthin im PS II-LHC II-Superkomplex, im helladaptierten Zustand dieses nun nicht mehr praktiziert und das es aber trotzdem einen kleinen Anteil von Carotinoiden gibt, zum Beispiel  $\beta$ -Carotin in PS I, das unabhängig von der Lichtstärke immer einen kleinen Teil der Energie transferiert.

Diese Hypothese wird durch die spektrale Abhängigkeit von  $\Phi_{Transfer}(t)$  in Abbildung 8-3 gestützt. Die Änderungen von  $\Phi_{Transfer}(t)$  sind für die Bulk-Fluoreszenz bei  $\sim 685$  nm größer als für die „rote“-Fluoreszenz bei  $\sim 730$  nm. Dieses steht in Einklang mit einer Quenching Seite, die eher bei den Bulk PS II Pigment-Protein-Komplexen liegt, und die Rolle des PS II Proteins unterstützt.

Abbildung 8-9 fasst noch einmal schematisch das vorgestellte Modell des molekularen Schaltmechanismus zusammen.



**Abbildung 8-9: Modell für den biophysikalischen Quenching-Mechanismus: Im gleichen Maße wie ein einzelnes Reaktionszentrum (RZ) im dunkeladaptierten Zustand a) Anregungsenergie von den umgebenen Lichtsammelpigmenten aufnehmen kann, kann im helladaptierten Zustand b) ein einzelnes Zeaxanthin Molekül überschüssige Energie aufnehmen und effizient innerhalb von 11 ps als Wärme ableiten, oder alternativ ein Radikal-Kation mit einer Lebensdauer von  $\sim 150$  ps bilden.**

Im dunkeladaptierten Zustand a) trägt eine Fraktion der Carotinoide, in diesem Fall vorwiegend Violaxanthin, über den einphotonen-verbotenen  $S_1$ -Zustand mit  $\sim 10$ - $30\%$  zum Prozess des Lichtsammelns bei. Im helladaptierten Zustand nach Starklichtbestrahlung der Pflanzen b) wird ein Teil der Carotinoide durch das Enzym VxDE in Zeaxanthin transformiert

und ist somit in der Lage, überschüssige Energie der Chlorophylle aufzunehmen und als Wärme oder durch Umwandlung in ein radikalisches Kation abzugeben.

Hierbei kann selbst ein einzelnes Zeaxanthin Molekül mit einer Energie, die unterhalb der Energie der anderen Pigmente liegt, als potentielle Energiefalle für überschüssige Energie agieren. Dieses kann die sehr schnelle Quenching-Antwort erklären, selbst wenn die biochemische Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin erst angefangen hat. Die überschüssige Energie wird dann als Wärme innerhalb von  $\sim 10$  ps abgegeben.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, kann es an der durchschnittlichen Transferzeit des Energietransfers zwischen Chlorophyllen und Carotinoiden liegen, dass im helladaptierten Zustand nur kleine Populationen des Car  $S_1$ -Zustandes gefunden werden. Dieses trifft besonders für Pigmente zu, die nicht am Quenching-Prozess beteiligt sind. Wenn also der Energietransfer von den Chlorophyllen auf die Carotinoide auf einer Zeitskala abläuft, die gleich oder größer ist, als die Zeit für die interne Konversion der Carotinoide Car  $S_1 \rightsquigarrow$  Car  $S_0$  von  $\sim 10$  ps, kann man nur sehr kleine Car  $S_1$  Populationen beobachten. Hierbei können kleine Variationen der relativen Energien in der Größenordnung von ein paar hundert Wellenzahlen in Anlehnung an eine Boltzman Verteilung große Effekte auf Populations-Wahrscheinlichkeiten der beteiligten Carotin-Zustände haben. Im Gegensatz dazu sind kleine Unterschiede bei den Chl  $Q_y \rightsquigarrow$  Car  $S_1$  Energietransferraten nicht so wichtig, wenn die Anregungs- Energieübertragung der limitierende Schritt ist.

Trotzdem können Pigmente in näherer Umgebung der Quenching-Seite instantan eine kleine transiente Population von Car  $S_1$  Zuständen ausbilden, die nach Ma<sup>[39]</sup> et al. innerhalb 10 ps relaxieren. Zusätzlich konnten Holt<sup>[38]</sup> et al. bei der vermehrten Bildung von Zeaxanthin- $S_1$  Zuständen die Entstehung von radikalischen Carotinoid-Kationen,  $Zea^{+*}$ , nachweisen, die eine Lebensdauer von  $\sim 150$  ps besitzen. Die Anstiegszeit von 11 ps des zusätzlichen transienten, radikalischen Carotinoid-Kationen-Signals, das in dieser Studie beobachtet wurde, korrespondiert gut mit der Lebenszeit des Zeaxanthin- $S_1$  Zustandes, die bei 9-11 ps liegt<sup>[14]</sup>.

Das hier vorgeschlagene Modell des Quenching-Mechanismus berücksichtigt keine Einflüsse von strukturellen Veränderungen innerhalb der Pigment-Protein-Komplexe.

Der einzige strukturelle Einfluss, der den Abfall von  $\Phi_{Transfer}(t) \propto F^{TPE}(t)/F^{OPE}(t)$  erklären könnte, wäre eine totale Entkopplung aller Carotinoide von den Chlorophyllen, die vorher Energie auf diese übertragen haben. Es erscheint allerdings als sehr unwahrscheinlich, dass ein solcher Mechanismus die beobachteten zeitabhängigen Veränderungen von  $\Phi_{Transfer}(t)$

erklären kann, und diese Hypothese wird auch nicht von den experimentellen Übereinstimmungen der Messdaten mit der Relation (34) gestützt. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet müssen allerdings folgen, um das vorgeschlagene Modell zu verifizieren.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Prozesse der Photosynthese untersucht, bei denen Carotinoide eine entscheidende Rolle spielen. Durch den einphotonen-verbotenen  $S_1$ -Zustand der Carotinoide ist die spektroskopische Analyse der angeregten Zustände der Carotinoide in Bezug auf die angeregten Zustände der benachbarten Chlorophylle schwierig durchzuführen. Mit der Methode der Zweiphotonenanregung (TPE) können die  $S_1$ -Zustände aber direkt angeregt werden und so die Energieflüsse über diesen Zustand bestimmt werden.

Für die Umsetzung von Zweiphotonenanregungen an biologischen Systemen wurde ein Lasersystem aufgebaut, das Femtosekundenpulse mit einer hohen Repetitionsrate von 125 kHz liefert.

Die Verwendung von Femtosekundenpulsen ist hierbei für zwei Vorgänge erforderlich:

- Die beobachteten Prozesse laufen auf Zeitskalen im sub-Pikosekundenbereich ab und erfordern deshalb zu ihrer experimentellen Analyse eine Zeitauflösung im fs-Bereich.
- Die Zweiphotonenanregung erfordert durch die quadratische Abhängigkeit der Anregungsintensität sehr hohe Energiedichten, die durch die erzeugten Femtosekundenpulse erreicht werden.

Erschwerend ist hierbei der Kompromiss aus möglichst niedriger Anregungsintensität, um keine Ausbleicheffekte und Multiphotonenprozesse wie Ionisation und ultraschnelle Triplettbildung in der Probe hervorzurufen<sup>[120]</sup> und gleichzeitig ausreichend hoher Anregungsintensität, um eine Zweiphotonenanregung möglich zu machen. Dieser Kompromiss aus Zweiphotonenanregung und Schutz der Probe gelang mit einer in dieser Doktorarbeit aufgebauten Versuchsanordnung mit einem hochrepetitiv verstärkten Lasersystem. Durch die hohe Repetitionsrate konnte die Anregungsintensität auf eine pro Puls-Energie von 1-2 nJ herabgesetzt werden sowie die benötigte Messzeit herabgesetzt werden, wodurch die biologischen Proben schonend angeregt wurden.

Für eine breite Variation der experimentell benötigten Wellenlängen sorgte ein optisch parametrischer Verstärker (OPA), der in Bereichen von 500-700 nm und 900-2400 nm durchstimmbar ist.

Mit diesem Lasersystem konnten wir bereits zahlreiche Ergebnisse erzielen. Pump-Probe Untersuchungen am Photosystem I zeigten, dass nach konventioneller Einphotonenanregung 44% der absorbierten Energie durch interne Konversion aus dem  $S_2$ -Zustand in den  $S_1$ -Zustand relaxiert, wovon 13% der Energie von hier aus innerhalb  $0,8 \pm 0,4$  ps auf die Chlorophylle übertragen wird. Die Messungen zeigten, dass nur durch direkte Car  $S_1$ -Anregung mittels Zweiphotonenanregung verlässliche Werte der Energietransferkinetiken gewonnen werden können und erklärte die breite Streuung der in der Literatur gefundenen Werte für die Lebensdauer und Population der Car  $S_1$ -Zustände im Photosystem I.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle der Carotinoide beim nichtphotochemischen Quenchings direkt in lebenden Pflanzen untersucht. Dieser Prozess steuert die Energieverteilung absorbierter Strahlung und schützt hierbei die Pflanzen dadurch, dass zu hohe absorbierte Energiemengen (bei zu großer Strahlungsintensität) als ungefährliche Wärme abgeführt werden können. Für den Prozess des nichtphotochemischen Quenchings wurden in der Literatur viele verschiedene Mechanismen vorgeschlagen<sup>[34,102,105]</sup>. Im von Frank et al. vorgestellten molekularen Schaltmechanismus (molecular gear-shift) wird vorgeschlagen, dass eine enzymatische Modifikation des konjugierten  $\pi$ -Systems von Xanthophyll-Carotinoiden ein Umschalten zwischen Carotinoid-Chlorophyll-Energiesammeln und Chlorophyll-Carotinoid-Quenchen über den Carotin  $S_1$ -Zustand erlaubt. Durch diese Variation der Anzahl konjugierter Doppelbindungen können die Carotinoide des Xanthophyll-Zyklus die Energie der  $S_1$ -Zustände anheben oder absenken und so die Übertragung von oder auf die Chlorophylle steuern. Durch die experimentell schwer zu bestimmende energetische Lage der  $S_1$ -Zustände der Xanthophylle wurde das Modell allerdings nie belegt oder widerlegt.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Methode der direkten Zweiphotonenanregung von Car  $S_1$ -Zuständen in lebenden Pflanzen ist durch Detektion der Chlorophyll a Fluoreszenz in der Lage, Rückschlüsse auf die Beteiligung dieser angeregten Zustände bei dem Prozess des molekularen Schaltmechanismus zu geben. Es wurden erstmalig Zweiphotonenanregungen an lebenden Pflanzen durchgeführt, was den Vorteil hat, absolut unbeeinflusst messen zu können. Aus den erhaltenen Ergebnissen geht klar hervor, dass die Abnahme von  $\Phi_{Transfer}(t) \propto F^{TPE}(t)/F^{OPE}(t)$  während der Starklichtadaption auf eine Umkehr des Energieflusses von den Chlorophyllen auf die Carotinoide hinweist. In weiteren Untersuchungen, muss nun herausgefunden werden, welcher der zahlreichen Pigment-

Protein-Komplexe des photosynthetischen Apparates tatsächlich an dieser Regulation beteiligt ist und wie groß der Anteil dabei ist.

Zum Beispiel ist der genaue Anteil des Protein-Komplexes LHC II (CP22) an dem Vorgang des nichtphotochemischen Quenchings noch nicht vollständig geklärt.

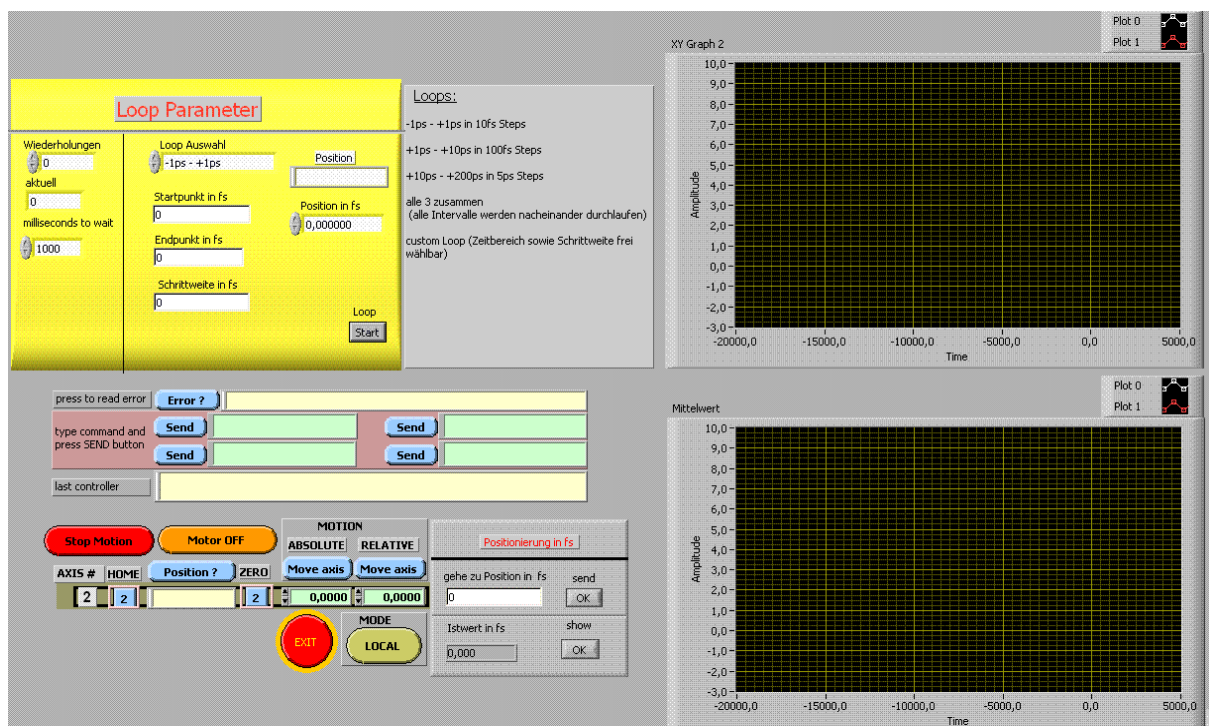
Allgemein ermöglicht die Zweiphotonenspektroskopie die zeitabhängige direkte Betrachtung der Populationen von sonst nicht nachweisbaren angeregten Zuständen der Photosynthese. Besonders die Zweiphotonenanregung von Carotinoiden lebender Pflanzen ermöglicht einen nicht in das Geschehen eingreifenden Einblick in die Prozesse der Photosynthese. Um den Einfluss der Xanthophylle in dem Prozess des NPQs vollständig aufzuklären, bedarf es nun weiterer Messungen. Anbieten würden sich hierbei Mutanten mit nur einer Xanthophyll-Spezies und Abwesenheit des VxDE-Enzyms.

Allgemein wird die Chlorophyll a Fluoreszenz schon sehr lange dazu benutzt, Pflanzenparameter zu bestimmen. Die Detektion der Fluoreszenz in Abhängigkeit der eingestrahlten Lichtintensität gibt nicht nur Aufschlüsse über NPQ-Parameter, sondern auch über die Vitalität der Pflanze. Ein kommerziell erhältliches Gerät für diese Zwecke ist das PAM Fluorometer (pulse amplitude modulated fluorometer) der Firma Waltz Effeltrich, das man in Zukunft um die Möglichkeit der Zweiphotonenanregung erweitern könnte, um einen direkten Einblick in die Carotin Energietransferdynamik in der Photosynthese zu erhalten.

## 10 Anhang

Die hier abgebildeten Grafiken stellen die wichtigsten Teile der mit Labview™ 6.1 programmierten Steuerungssoftware des Pump-Probe Experimentes dar. Der Vorteil der auf der Programmiersprache C++ basierenden Sprache Labview™ liegt in der integrierten grafischen Oberfläche. Die Steuerung und Bedienung des Programms wird hierdurch erleichtert. Die Anschlüsse der grafischen Oberfläche können auf einer virtuellen Rückseite belegt und miteinander verbunden werden. Dafür stehen eine Reihe fertiger Funktionen (VIs) zur Verfügung, die individuell angepasst werden können. Der zeitliche Ablauf der einzelnen Sequenzen verläuft immer von außen nach innen.

Anfangen mit der Bedienoberfläche werden die wichtigsten Sequenzpunkte chronologisch dargestellt.

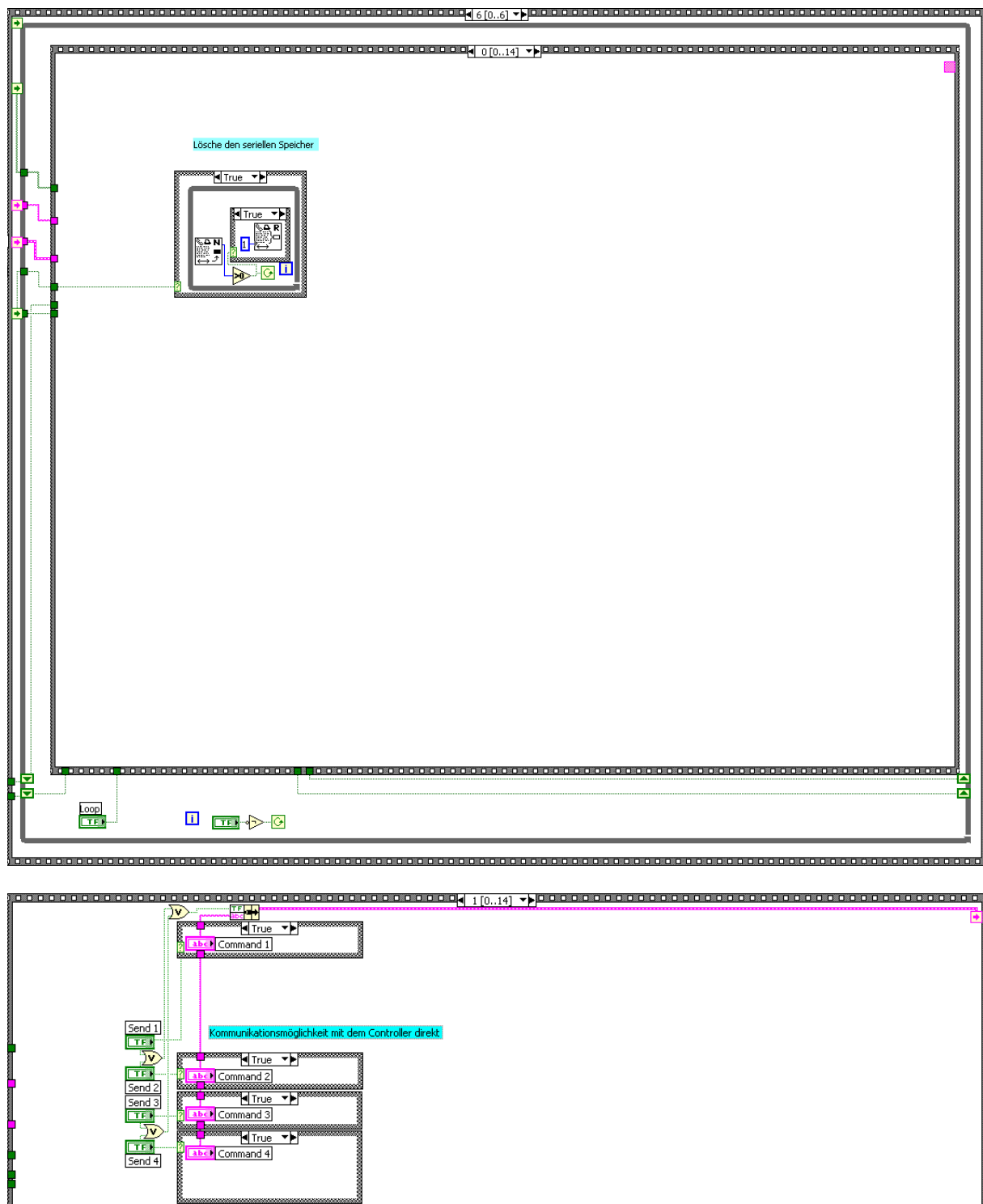


Es folgen die Sequenzen, die Kommunikationsparameter mit dem Newport Stagecontroller festlegen. Hierbei werden nur Sequenzpunkte gezeigt, die den elementaren Ablauf der Software zeigen. Dieser äußere Sequenzablauf läuft bei jedem Software-Start einmalig ab und garantiert eine stabile Permanentverbindung.

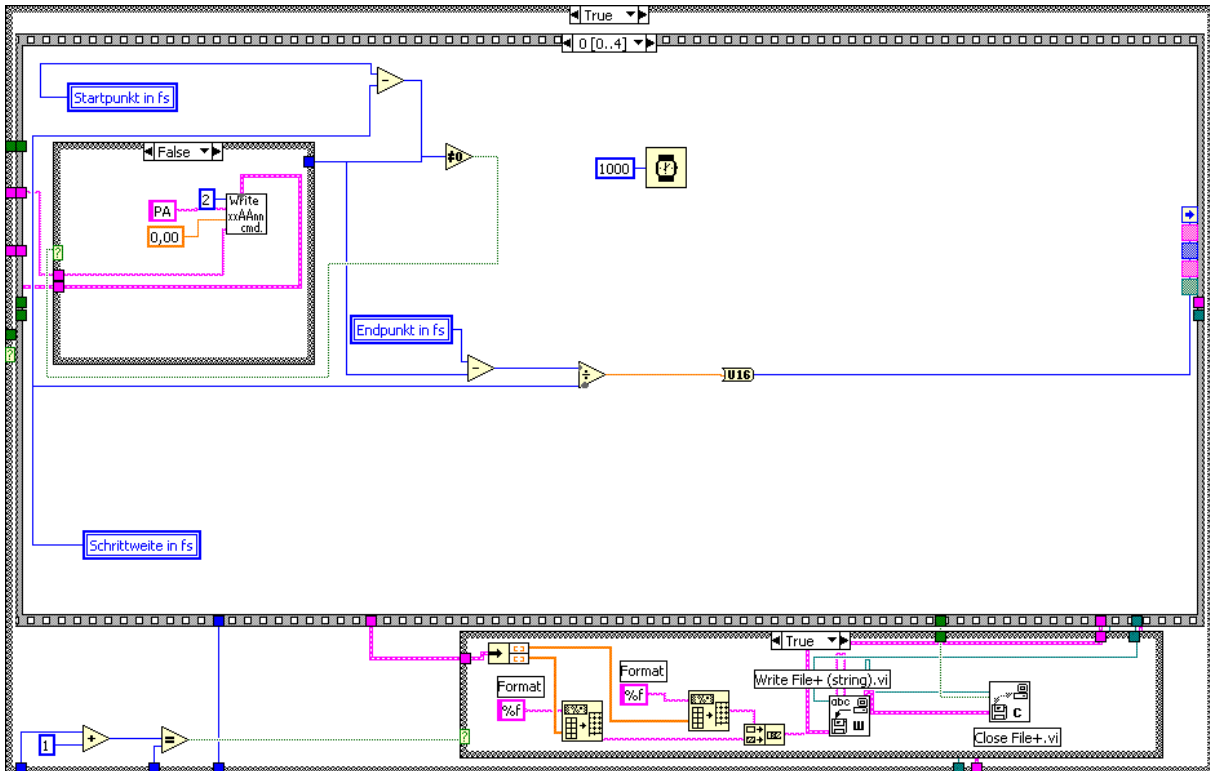


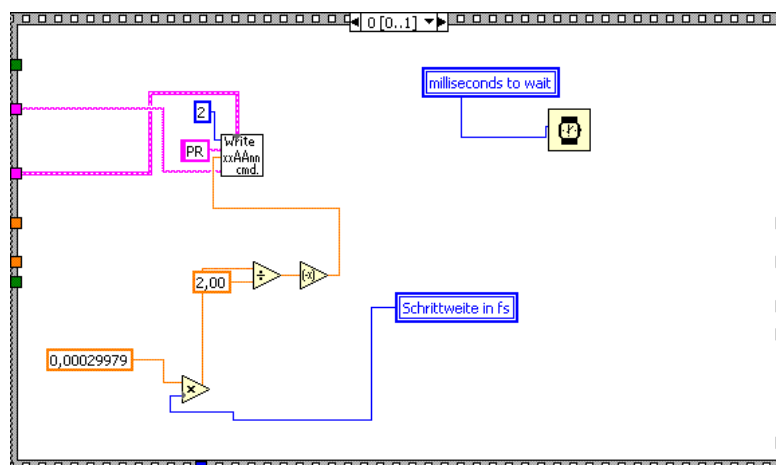
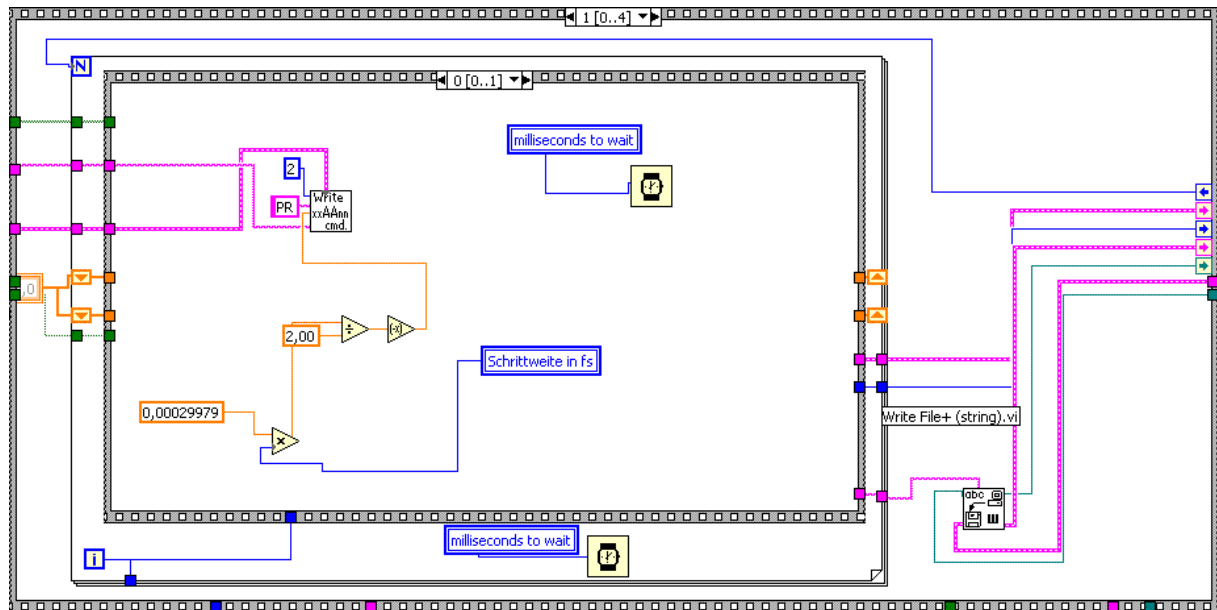
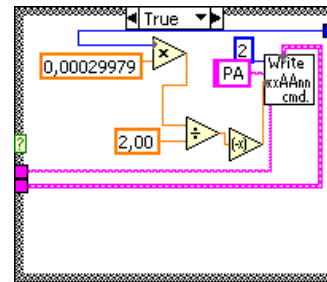
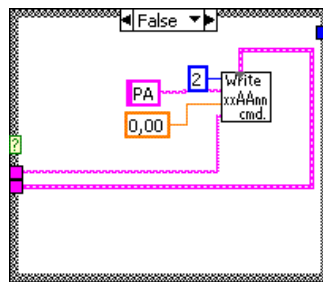


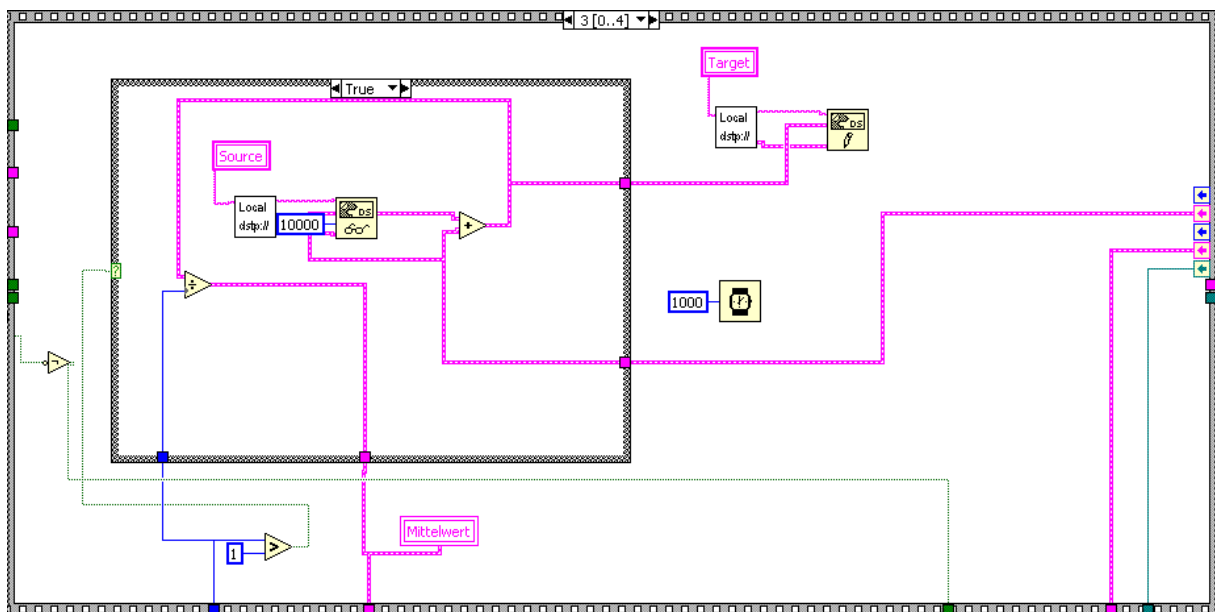
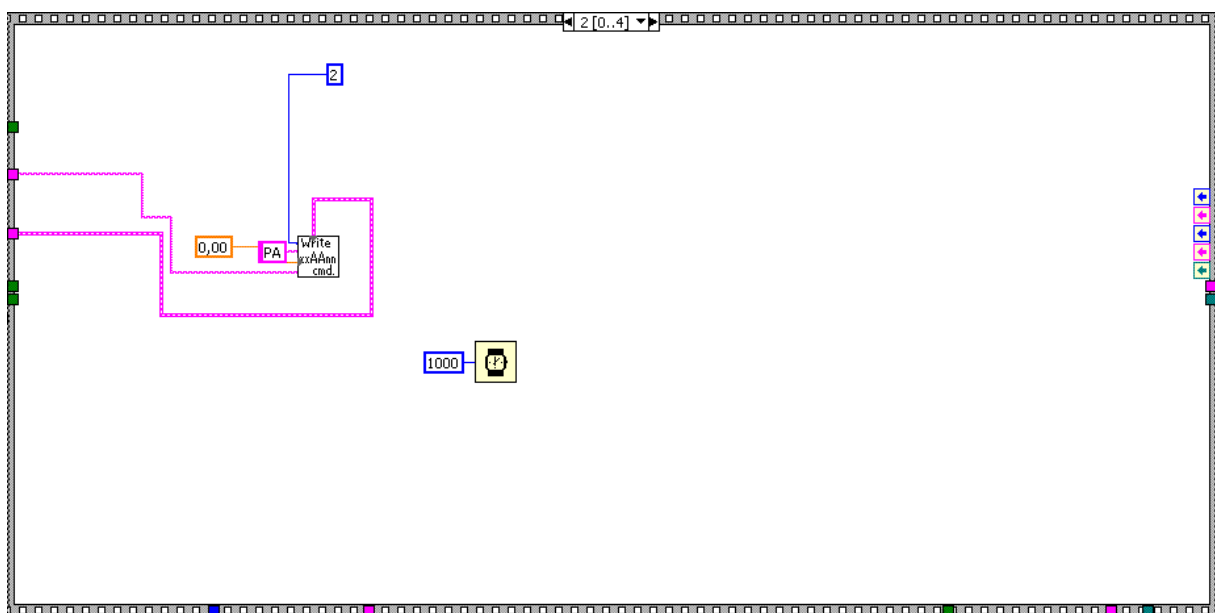
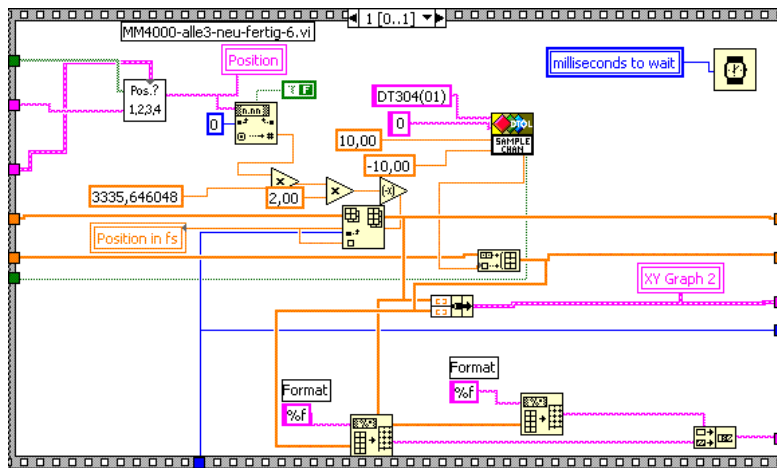
Es folgt eine innere Sequenz mit Steuerungselementen der Linearstage sowie programmierten Loops.

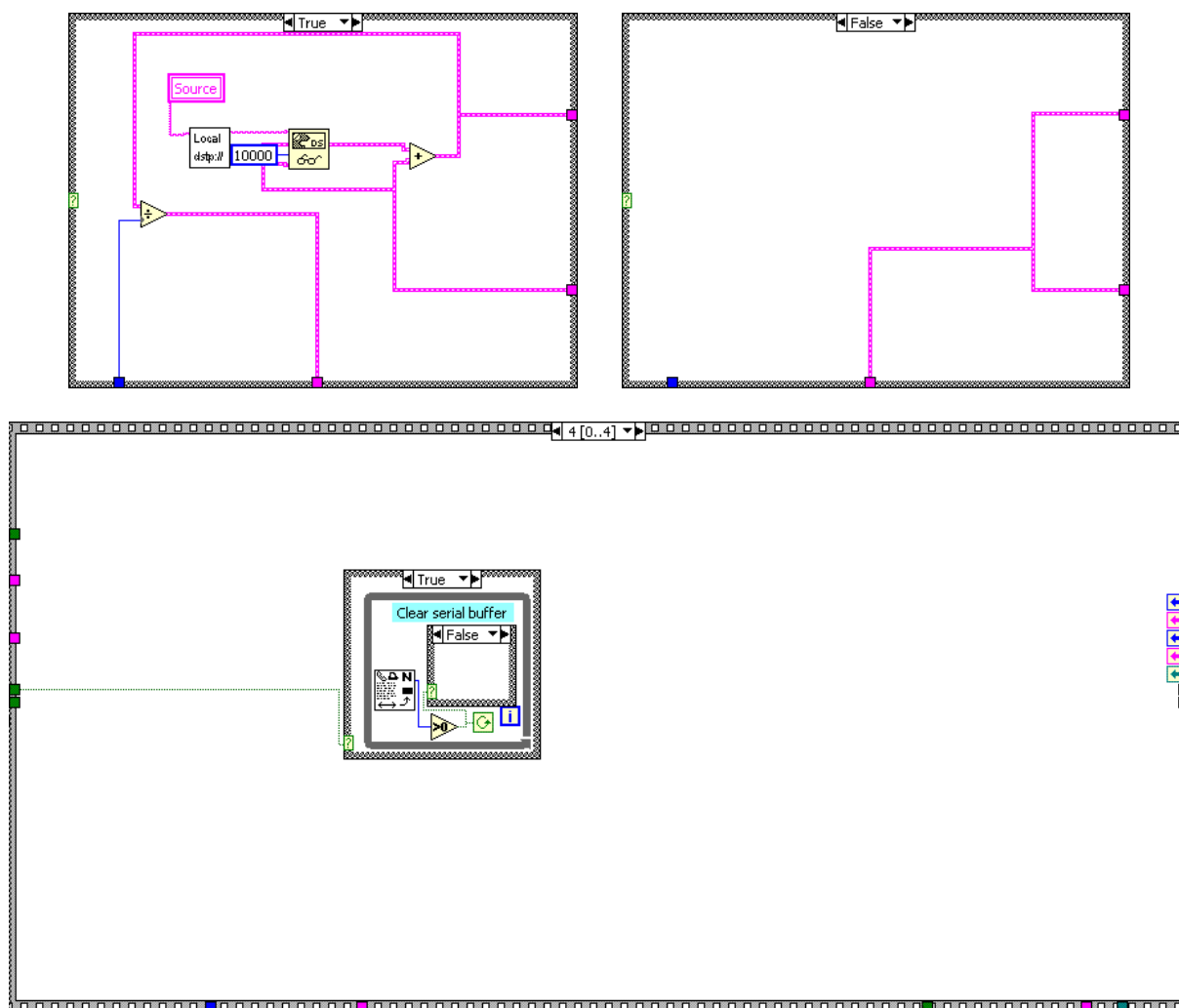


Beispiel eines von vier möglichen Loops, hier mit vollständig frei wählbaren Parametern (Anfangs-, Endpunkt und Schrittweite). Hierbei wechseln sich fortwährend eine Positionierung der Linearstage und ein Auslesen der Photodiode über die AD-Wandlerkarte ab, die zusammen einen xy-Wert bilden

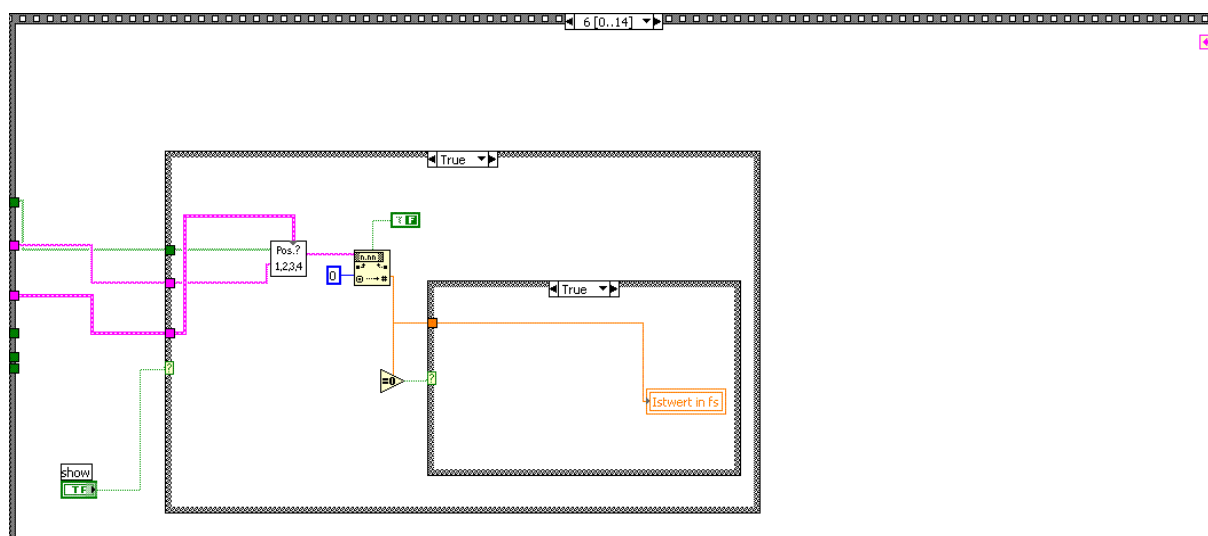


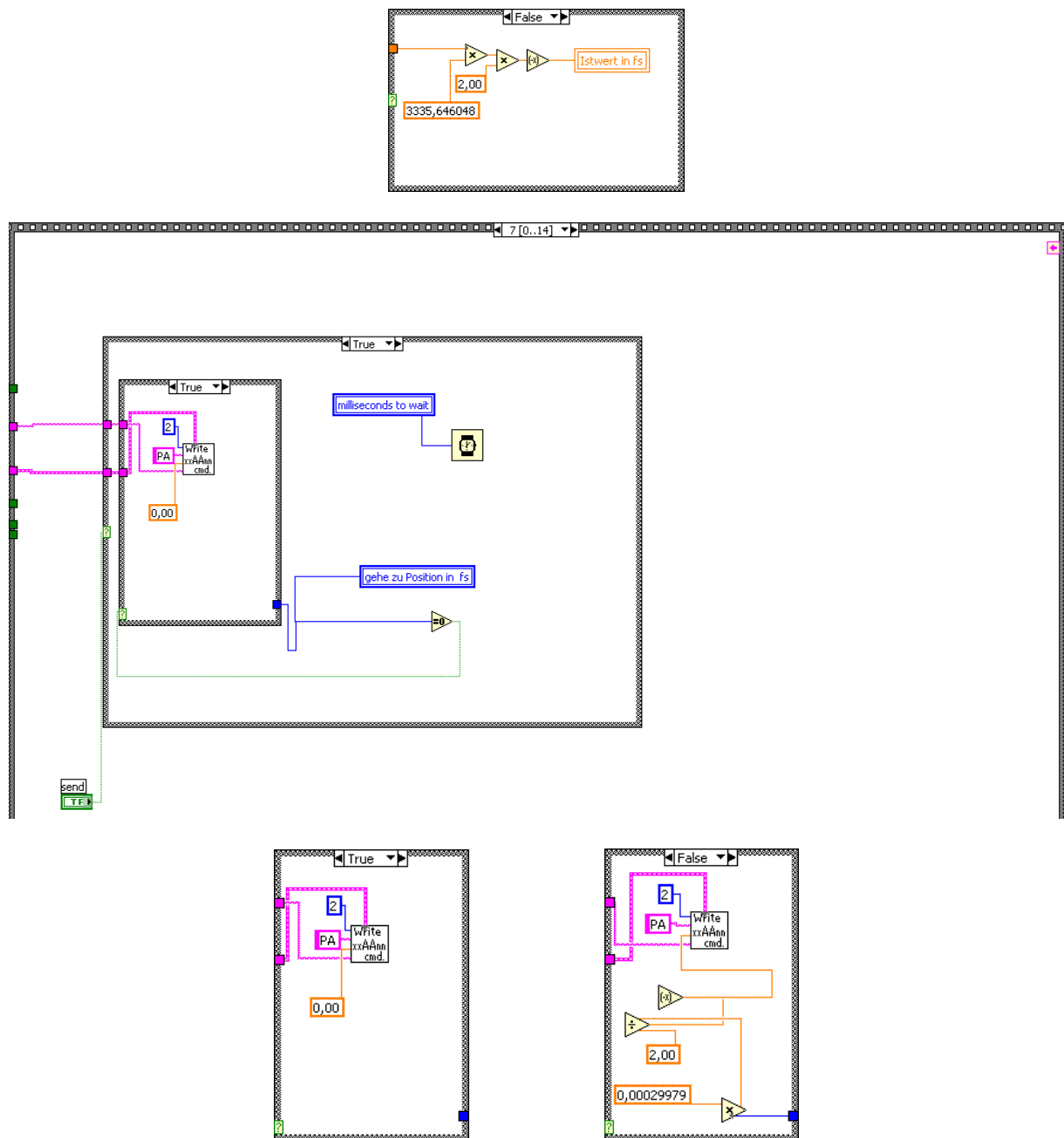






Positionierung der Linearstage direkt auf der Femtosekundenzeitskala, um den genauen Nullpunkt für Pump-Probe Experimente festzulegen.





## 11 Literatur

- (1) Mojzsis, S. J.; Arrhenius, G.; McKeegan, K. D.; Harrison, T. M.; Nutman, A. P.; Friend, C. R. *Nature* **1996**, *384*, 55-59.
- (2) Schidlowski, M. *Nature* **1988**, *333*, 313-318.
- (3) Schopf, J. W. *Science* **1993**, *260*, 640-646.
- (4) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie*; 5 ed.; Spektrum, **2003**.
- (5) Ke, B. *Photosynthesis - Photobiochemistry and Photobiophysics*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **2001**; Vol. 10.
- (6) Hudson, B. S.; Kohler, B. E.; Schulten, K. *Excited States*; Academic Press: New York, **1982**; Vol. 6.
- (7) Walla, P. J.; Linden, P. A.; Hsu, C. P.; Scholes, G. D.; Fleming, G. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 10808-10813.
- (8) Wehling, A.; Walla, P. J. *J. Phys. Chem. B, Vol. 109, No. 51, 2005* **2005**, *109*, 24510-24516.
- (9) Walla, P. J.; Yom, J.; Krueger, B. P.; Fleming, G. R. *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 4799-4806.
- (10) Walla, P. J.; Linden, P. A.; Ohta, K.; Fleming, G. R. *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 1909-1916.



- (11) Hilbert, M.; Wehling, A.; Schlodder, E.; Walla, P. J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13022.
- (12) Walla, P. J.; Linden, P. A.; Fleming, G. R. in *Ultrafast Phenomena XII*, T. Elsaesser, S. Mukamel, M. Murmane, N. F., Eds., Springer: New York **2000**, 671-673.
- (13) Krueger, B. P.; Yom, J.; Walla, P. J.; Fleming, G. R. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *310*, 57-64.
- (14) Polívka, T.; Sundström, V. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2021-2071.
- (15) Blankenship, R. E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*; Blackwell Science, **2002**.
- (16) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; Garland Science: New York, **2002**.
- (17) Häder, D.-P. *Photosynthese*; Thieme, **1999**.
- (18) Jordan, P. *Röntgenstrukturanalyse des trimeren Photosystems I aus dem Cyanobakterium Synechococcus elongatus bei 2,5 Å Auflösung*; Dissertation; Freie Universität Berlin: Berlin; **2001**.
- (19) Saenger, W.; Jordan, P.; Krauß, N. *Current Opinion in Structural Biology* **2002**, *12*, 244-254.
- (20) Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H. T.; Klukas, O.; Saenger, W.; Krauß, N. *Nature* **2001**, *411*, 909-917.
- (21) Byrdin, M.; Jordan, P.; Krauß, N.; Fromme, P.; Stehlik, D.; Schlodder, E. *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 433-457.

- (22) Damjanovic, A.; Vaswani, H. M.; Fromme, P.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10251-10262.
- (23) Zuoni, A.; Witt, H. T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauß, N.; Saenger, W.; Orth, P. *Nature* **2001**, *409*, 739-743.
- (24) Loll, B.; Kern, J.; Zuoni, A.; Saenger, W.; Biesiadka, J.; Irrgang, K.-D. *Photosynth. Res.* **2005**, *86*, 175-184.
- (25) Loll, B. *Photosystem II from the Cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus at 3.2 Å Resolution*; Dissertation; Freie Universität Berlin: Berlin; **2004**.
- (26) Barber, J.; Nield, J. *Philos. T. Roy. Soc. B* **2002**, *357*, 1329-1335.
- (27) Hankamer, B.; Barber, J.; Boekema, E. J. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1997**, *48*, 641-672.
- (28) Hankamer, B.; Morris, E.; Nield, J.; Gerle, C.; Barber, J. *J. Struct. Biol.* **2001**, *135*, 262-269.
- (29) Hankamer, B.; Nield, J.; Zheleva, D.; Boekema, E. J.; Jansson, S.; Barber, J. *European Journal of Biochemistry* **1997**, *243*, 422-429.
- (30) Liu, Z.; Wang, K.; Kuang, T.; Zhang, J.; Gui, L.; An, X.; Chang, W. *Nature* **2004**, *428*, 287-292.
- (31) Boekema, E. J.; van Roon, H.; van Breemen, J. F. L.; Dekker, J. P. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *266*, 444-452.
- (32) Strain, H. H.; Thomas, M. R.; Katz, J. J. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1963**, *75*, 306-311.
- (33) Vernon, L. P.; Seely, G. R. *The Chlorophylls*; Academic Press: New York, **1966**.

- (34) Papageorgiou, G. C.; Govindjee *Chlorophyll a Fluorescence - A Signature of Photosynthesis*; Springer, **2004**.
- (35) Weber, G.; Teale, F. W. J. *Trans. Far. Trans.* **1957**, *53*, 646-655.
- (36) Frank, H. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *385*, 53–60.
- (37) Dreuw, A.; Fleming, G. R.; Head-Gordon, M. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5*, 3247-3256.
- (38) Holt, N. E.; Zigmantas, D.; Valkunas, L.; Li, X. P.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R. *Science* **2005**, *307*, 433-436.
- (39) Ma, Y. Z.; Holt, N. E.; Li, X. P.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 4377-4382.
- (40) Müller, P.; Li, X. P.; Niyogi, K. K. *Plant Physiology* **2001**, *125*, 1558–1566.
- (41) Haken, H.; Wolf, H. W. *Molekülphysik und Quantenchemie*; Springer Verlag: Berlin, **1994**; Vol. 2.
- (42) Wagniere, G. H. *Linear and Nonlinear Optical Properties of Molecules*; Helvetica Chimica Acta: Basel, **1993**.
- (43) Tavan, P.; Schulten, K. *Phys. Rev. B* **1987**, *36*, 4337-4358.
- (44) Zechmeister, L.; Polgar, A. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65*, 1522-1528.
- (45) Göppert-Mayer, M. *Ann. Phys.* **1931**, *9*, 273-295.
- (46) Birge, R. R. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 138-146.

- 
- (47) Shima, S.; Ilagan, R. P.; Gillespie, N.; Sommer, B. J.; Hiller, R. G.; Sharples, F. P.; Frank, H. A.; Birge, R. R. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 8052-8066.
- (48) Shreve, A. P.; Trautman, J. K.; Owens, T. G.; Albrecht, A. C. *Chemical Physics Letters* **1990**, *170*, 51-56.
- (49) Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 21-26.
- (50) Gilmore, A. M.; Hazlett, T. L.; Govindjee *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 2273-2277.
- (51) Gilmore, A. M.; Shinkarev, V. P.; Hazlett, T. L.; Govindjee *Biochemistry* **1998**, *37*, 13582-13593.
- (52) Gilmore, A. M.; Yamamoto, H. Y. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 391-402.
- (53) Jahns, P.; Schweig, S. *Plant. Physiol. Biochem.* **1995**, *33*, 683-687.
- (54) Schinner, K. *Signalanalyse der Austauschvorgänge zwischen Photosynthese und Respiration in Hinblick auf die stickstoffformabhängige Lichtstreibresistenz*; Dissertation; Christian-Ahlbrechts-Universität: Kiel; **2001**.
- (55) Krause, G. H.; Weis, E. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 313-349.
- (56) Schreiber, U. *Photosynth. Res.* **1986**, *9*, 261-272.
- (57) Schreiber, U.; Bilger, W. *Prog. Bot.* **1993**, *54*, 151-173.
- (58) Krause, G. H.; Vernotte, C.; Briantais, J.-M. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1982**, *679*, 116-124.
- (59) Eskling, M.; Arvidsson, P.-O.; Akerlund, H.-E. *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 806-816.

- (60) Frank, H. A.; Young, A. J.; Britton, G.; Cogdell, R. J. *The Photochemistry of Carotenoids*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **2000**.
- (61) Bassi, R.; Caffarri, S. *Photosynth. Res.* **2000**, *64*, 243-256.
- (62) Crofts, A. R.; Yerkes, C. T. *FEBS Letters* **1994**, *352*, 265-270.
- (63) Horton, P.; Ruban, A. V.; Wentworth, M. *Philos. T. Roy. Soc. B* **2000**, *355*, 1361-1370.
- (64) Ruban, A. V.; Horton, P. *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 221-230.
- (65) Frank, H. A.; A, C.; Chynwat, V.; Young, A. J.; Gosztola, D.; Wasielewski, M. R. *Photosynth. Res.* **1994**, *41*, 389-395.
- (66) Aro, E.-M.; Virgin, I.; Andersson, B. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1993**, *1143*, 113-134.
- (67) Allen, J. F. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1992**, *1098*, 275-335.
- (68) Bennett, J.; Steinback, K. E.; Arntzen, C. J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 5253-5257.
- (69) Horton, P.; Black, M. T. *FEBS Letters* **1980**, *119*, 141-144.
- (70) Krause, G. H.; Behrend, U. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1983**, *723*, 176-181.
- (71) Schansker, G.; van Rensen, J. J. S. *Photosynth. Res.* **1999**, *62*, 175-184.
- (72) Walters, R. G.; Horton, P. *Photosynth. Res.* **1991**, *27*, 121-133.

- (73) Walters, R. G.; Horton, P. *Photosynth. Res.* **1993**, *36*, 119-139.
- (74) Govindjee *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 131-160.
- (75) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1999**.
- (76) Förster, T. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- (77) Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836.
- (78) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; The Benjamin/Cumming Publishing Company, **1978**.
- (79) Damjanovic, A.; Ritz, T.; Schulten, K. *Phys. Rev. E* **1999**, *59*, 3293-3311.
- (80) Nagae, H.; Kakitani, T.; Kotoh, T.; Mimuro, M. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 8012-8023.
- (81) Coherent, I. *Vitesse Duo Laser Operator's Manual*; **2004**.
- (82) Bass, M.; van Stryland, E. W.; Williams, D. R.; Wolfe, W. L. *Handbook of Optics (Devices, Measurements & Properties)*; Optical Society of America, **1995**; Vol. 2.
- (83) Meschede, D. *Optik, Licht und Laser*; Teubner, **2003**.
- (84) Coherent, I. *RegA Model 9000 Laser Operator's Manual*; **1997**.
- (85) Coherent, I. *Optical Parametric Amplifier Operator's Manual*; **1994**.
- (86) Diels, C. *Ultrashort laser pulse phenomena*; Academic Press: San Diego, **1995**.

- (87) Rulliere, C. *Femtosecond laser pulses: principles and experiment*; Springer Verlag, **1998**.
- (88) Demtroeder, W. *Laser Spectroscopy*; Springer Verlag, **2003**.
- (89) Kennis, J. T. M.; Gobets, B.; van Stokkum, I. H. M.; Dekker, J. P.; van Grondelle, R.; Fleming, G. R. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 4485-4494.
- (90) van der Lee, J.; Bald, D.; Kwa, S. L. S.; van Grondelle, R.; Rögner, M.; Dekker, J. P. *J. P. Photosynth. Res.* **1993**, *35*, 311-321.
- (91) de Weerd, F. L.; Kennis, J. T. M.; Dekker, J. P.; van Grondelle, R. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5995-6002.
- (92) Holt, N. E.; Kennis, J. T. M.; Fleming, G. R. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19029-19035 **2004**, *108*, 19029-19035.
- (93) Fromme, P.; Witt, H. T. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1998**, *1365*, 175-184.
- (94) de Weerd, F. L.; van Stokkum, I. H. M.; van Grondelle, R. *Chemical Physics Letters* **2002**, *354*, 38-43.
- (95) Macpherson, A. N.; Gillbro, T. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 5049-5058.
- (96) Nagae, H.; Kuki, M.; Zhang, J.-P.; Sashima, T.; Mukai, Y.; Koyama, Y. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4155-4166.
- (97) Hornung, T.; Skenderovic', H.; Motzkus, M. *Chemical Physics Letters* **2005**, *402*, 283-288.

- (98) de Weerd, F. L.; Dekker, J. P.; van Grondelle, R. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 6214-6220.
- (99) Larsen, D. S.; Papagiannakis, E.; van Stokkum, I. H. M.; Vengris, M.; Kennis, J. T. M.; van Grondelle, R. *Chemical Physics Letters* **2003**, *381*, 733-742.
- (100) Horton, P.; Ruban, A. V.; Walters, R. G. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1996**, *47*, 655-684.
- (101) Havaux, M.; Tardy, F.; Yves, L. *Planta* **1998**, *205*, 242-250.
- (102) Frank, H. A.; Cua, A.; Chynwat, V.; Young, A.; Gosztola, D.; Wasielewski, M. R. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1996**, *1277*, 243-252.
- (103) Ruban, A. V.; Horton, P. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 531-542.
- (104) Li, X. P.; Björkman, O.; Shih, C.; Grossman, A. R.; Rosenquist, M.; Jansson, S.; Niyogi, K. K. *Nature* **2000**, *403*, 391-395.
- (105) Niyogi, K. K.; Li, X. P.; Rosenberg, V.; Jung, H.-S. *Journal of Experimental Botany* **2005**, *56*, 375 - 382.
- (106) Havaux, M.; Dall'Osto, L.; Cuine, S.; Giuliano, G.; Bassi, R. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 13878-13888.
- (107) Pascal, A. A.; Liu, Z.; Broess, K.; van Oort, B.; van Amerongen, H.; Wang, C.; Horton, P.; Robert, B.; Chang, W.; Ruban, A. *Nature* **2005**, *436*, 134-137.
- (108) Standfuss, J.; Terwisscha van Scheltinga, A.; Lamborghini, M.; Kühlbrandt, W. *EMBO J.* **2005**, *24*, 919-928.
- (109) Frank, H. A.; Bautista, J. A.; Josue, J. S.; Young, A. J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2831-2837.



- (110) Josue, J. S.; Frank, H. A. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 4815-4824.
- (111) Young, A. J.; Frank, H. A. *J. Photochem. Photobio.* **1996**, *36*, 3-15.
- (112) Polívka, T.; Herek, J. L.; Zigmantas, D.; Åkerlund, H.-E.; Sundström, V. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1999**, 4914-4917.
- (113) Polívka, T.; Zigmantas, D.; Sundström, V.; Formaggio, E.; Cinque, G.; Bassi, R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 439-450.
- (114) Demmig-Adams, B. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1990**, *1020*, 1-24.
- (115) Neubauer, C. *Plant Physiol.* **1993**, *103*, 575-583.
- (116) Pfündel, E.; Bilger, W. *Photosynth. Res.* **1994**, *42*, 89-109.
- (117) Horton, P.; Ruban, A. V.; Walters, R. G. *Plant Physiology* **1994**, *106*, 415-420.
- (118) Förster, T. in *Modern Quantum Chemistry*, ed. Sinanoglu, O. (Academic, New York) **1965**, Vol III, 93-137.
- (119) Franck, J.; Teller, E. *J. Chem. Phys.* **1938**, 861-872.
- (120) Heinz, B.; Buckup, T.; Wohlleben, W.; Hashimoto, H.; Motzkus, M. *results presented at the meeting of the german physical society in munich 2004.*

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all die Personen nennen, die wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. P.J. Walla danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, den Aufbau einer neuen Arbeitsgruppe mitzuerleben. Seine vorbildliche Betreuung verbunden mit seiner ständigen Bereitschaft zur Diskussion führte zum guten Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. K.H. Gericke danke ich für die Übernahme des Korreferats sowie seinem gesamten Arbeitskreis für die Leihgabe diverser Apparaturen.

Den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt danke ich für die professionelle Umsetzung meiner zahlreichen „Sonderwünsche“.

Den Mitgliedern unserer Braunschweiger Arbeitsgruppe, Jan Frähmcke, Claudia Quentmeier und Stefan Bode, danke ich für die lustigen Stunden und die Hilfe bei dieser Arbeit. Dem Göttinger Teil unserer Gruppe mit Anna Cypionka, Michael Hilbert, Hendrik Hippchen und Wiebke Pohl danke ich für nette Seminare, Gespräche und Diskussionen.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie mich immer motiviert und mir den Rücken frei gehalten haben.

Meiner Freundin, Inés Christlieb, danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und für die Hilfe bei der Durchsicht dieser Arbeit.